

**Bedeutung der WT1-Genexpression
als molekularer Marker residueller Leukämiezellen vor
und nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation
im Kindesalter**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Caroline Woehlecke
geboren am 29.10.1989
in Magdeburg

Gutachter (akademischer Grad, Vor- und Nachname sowie Wirkungsort)

1. Prof. Dr. Bernd Gruhn, Jena

2. PD Dr. Thomas Ernst, Jena

3. Prof. Dr. Ingo Müller, Hamburg

Tag der öffentlichen Verteidigung: 05.10.2015

Abkürzungsverzeichnis

ABL	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1 (Gen)
ALL	akute lymphoblastische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
BAACL	brain and acute leukemia, cytoplasmic (Gen)
BCR	breakpoint cluster region (Gen)
BFM	Berlin-Frankfurt-Münster
CBFB	core-binding factor, beta subunit (Gen)
CC	kompletter Spenderchimärismus (complete chimerism)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CML	chronische myeloische Leukämie
CMML	chronische myelomonozytäre Leukämie
DLI	Infusion von Spenderlymphozyten (donor lymphocyte infusion)
ETO	eight-twenty one oncoprotein (Gen)
FAB	French-American-British
G-CSF	granulocyte colony stimulating factor
GVHD	Graft-versus-host Erkrankung
GVL	Graft-versus-leukemia
HLA	humanes Leukozytenantigen
HSZT	hämatopoetische Stammzelltransplantation
Ig	Immunglobulin
JMML	juvenile myelomonozytäre Leukämie
MC	gemischter Spenderchimärismus (mixed chimerism)
MDS	myelodysplastische Syndrome
MLL	mixed lineage leukemia (Gen)
MRD	minimale Resterkrankung (minimal residual disease)
mSv	Millisievert (Einheit der Äquivalenzdosis)
MYH11	myosin, heavy chain 11, smooth muscle (Gen)
NPM1	Nucleophosmin (Gen)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PML	promyelocytic leukemia (Gen)

PRAME	preferentially expressed antigen of melanoma (Gen)
RAEB	refraktäre Anämie mit Blastenvermehrung
RAEB-T	refraktäre Anämie mit Blastenvermehrung in Transformation
RARA	retinoic acid receptor alpha (Gen)
RCC	refraktäre Zytopenie im Kindesalter
RNA	Ribonukleinsäure
RT	reverse Transkriptase
SNP	single nucleotide polymorphism
STR	short tandem repeat
TZR	T-Zellrezeptor
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WT1	Wilms-Tumor 1 (Gen)

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung.....	3
2.1. Maligne hämatologische Erkrankungen im Kindesalter	3
2.1.1. Akute lymphoblastische Leukämie	3
2.1.2. Akute myeloische Leukämie	4
2.1.3. Chronische myeloische Leukämie	5
2.1.4. Myelodysplastische Syndrome und myeloproliferative Erkrankungen	6
2.2. Hämatopoetische Stammzelltransplantation	6
2.2.1. Spendersuche und Stammzellquellen.....	8
2.3. Minimale Resterkrankung	9
2.3.1. Wilms-Tumor-Gen 1	11
2.3.2. Chimärismusanalyse	12
3. Ziele der Arbeit	14
4. Publizierte Originalarbeiten.....	15
4.1. Prognostic impact of WT1 expression prior to hematopoietic stem cell transplantation in children with malignant hematological diseases. Woehlecke C, Wittig S, Arndt C, Gruhn B; Journal of Cancer Research and Clinical Oncology 2014 Sep 20. [Epub ahead of print]; DOI 10.1007/s00432-014-1832-y,	15
4.2. Detection of relapse after hematopoietic stem cell transplantation in childhood by monitoring of WT1 expression and chimerism, Woehlecke C, Wittig S, Sanft J, Kreyenberg H, Gruhn B; Journal of Cancer Research and Clinical Oncology 2015 Jan 24; [Epub ahead of print]; DOI 10.1007/s00432-015-1919-0	16
5. Diskussion	17
5.1. WT1-Expression vor HSZT.....	17
5.2. WT1-Expression nach HSZT	19
5.2.1. Analyse des Spenderchimärismus	21

5.3. Methodik und Limitationen	23
5.4. Ausblick.....	25
6. Schlussfolgerungen.....	27
7. Literatur- und Quellenverzeichnis	29
8. Anhang.....	43
8.1. Ehrenwörtliche Erklärung	43
8.2. Danksagung	44

1. Zusammenfassung

Maligne hämatologische Erkrankungen sind die häufigsten Krebserkrankungen im Kindesalter. Da sie nicht immer mit einer konventionellen Chemotherapie geheilt werden können, stellen Leukämien und myelodysplastische Syndrome auch die häufigste Indikation für eine hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT) dar. Durch verbesserte Therapiemöglichkeiten assoziierter Komplikationen ist ein Therapieversagen heute meist Rezidiven nach Transplantation geschuldet. Mithilfe molekularer Marker für die minimale Resterkrankung (MRD) können solche Rezidive jedoch frühzeitig vorhergesagt und therapeutisch beachtet werden.

Allerdings sind dafür nur in einigen Fällen spezifische Marker wie Fusionsgene verfügbar. Da das Wilms-Tumor-Gen 1 (WT1) bei hämatologischen Erkrankungen ubiquitär überexprimiert ist, wurde es als universeller Marker vorgeschlagen. Es soll untersucht werden, inwiefern die WT1-Genexpression vor und nach HSZT für die Prognoseeinschätzung und Rezidivvorhersage geeignet ist. In einem weiteren Teil soll die Sensitivität und Spezifität der WT1-Genexpression mit dem Nachweis eines gemischten Spenderchimärismus (MC) verglichen werden.

Zu diesem Zweck wurden Blut- und Knochenmarkproben von Patienten, die in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums der Friedrich-Schiller-Universität Jena eine HSZT erhalten haben, auf die Höhe ihrer WT1-Genexpression untersucht. Eingeschlossen wurden pädiatrische Patienten mit akuter lymphoblastischer Leukämie (ALL), akuter myeloischer Leukämie (AML), chronischer myeloischer Leukämie (CML), myelodysplastischen Syndromen (MDS) und juveniler myelomonozytärer Leukämie (JMML). Aus den zuvor kryokonservierten Proben wurde zunächst RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Diese wurde anschließend mit einer Real Time quantitativen reverse Transkriptase Polymerasenkettenreaktion (RT-PCR) quantifiziert. Die Proben wurden einmalig vor und in regelmäßigen Abständen nach Transplantation mit Einverständnis der Eltern entnommen. Für die Analysen des Chimärismus wurden Daten des Instituts für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Jena sowie im Rahmen von Studien gewonnene Daten des Universitätsklinikums Frankfurt verwendet.

Es konnte nachgewiesen werden, dass die WT1-Expression vor HSZT eine prognostische Bedeutung hat, wobei hohe Werte mit mehr Rezidiven und einem schlechteren Überleben verbunden waren. Dieser Zusammenhang war in der Einzelbetrachtung allerdings nur für Patienten mit AML sowie mit MDS und JMML hochsignifikant. Wegen hier fehlender Alternativen der MRD-Bestimmung haben diese Ergebnisse für die genannten Patientenkollektive jedoch auch die größte klinische Relevanz. WT1 war dabei umfassend sowohl in univariater als auch multivariater Analyse anderen Einflussfaktoren überlegen.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Rezidive anhand der Höhe der WT1-Expression, und speziell durch ansteigende Werte, frühzeitig erkannt werden können. Im Rezidiv selbst zeigten alle Patienten erhöhte WT1-Werte. Allerdings waren weder WT1-Expression noch Chimärismusanalyse in der Lage, alle Rezidive frühzeitig zu erkennen. Zumindest teilweise war dies zu großen Untersuchungsintervallen geschuldet. Durch die Kombination beider Methoden ließ sich die Sensitivität jedoch deutlich erhöhen, sodass insgesamt eine Sensitivität von 81,5 % bei einer Spezifität von 83,7 % erreicht werden konnte.

Bei fehlenden spezifischen MRD-Markern erscheint eine Einteilung in Risikogruppen anhand der Höhe der WT1-Expression vor Transplantation sinnvoll. An die HSZT anschließend kann eine engmaschige Überwachung von WT1 und Chimärismus Rezidive frühzeitig erkennen lassen. Daher sollten sowohl die Werte vor als auch nach Transplantation zur klinischen Entscheidungsfindung über immuntherapeutische Interventionen herangezogen und die klinische Relevanz dieses Verfahrens in einer prospektiven klinischen Studie weiter evaluiert werden.

2. Einleitung

2.1. Maligne hämatologische Erkrankungen im Kindesalter

Maligne hämatologische Erkrankungen stellen die häufigsten Krebserkrankungen im Kindesalter dar. Sie sind gekennzeichnet durch die klonale Vermehrung einer blutbildenden Zelle. Diese verläuft bei Kindern zumeist akut und progredient und ist oft mit einer erworbenen chromosomalen Aberration verbunden.

Am weitaus häufigsten tritt hierbei die ALL auf. Anders als im Erwachsenenalter sind 83 % aller kindlichen Leukämien lymphoblastischen Ursprungs (Lampert et al. 2013).

2.1.1. Akute lymphoblastische Leukämie

Die ALL stellt mit 25 % aller Krebserkrankungen unter 15 Jahren die häufigste maligne pädiatrische Erkrankung der Industriestaaten dar (Pui und Evans 2006). Ihre jährliche Inzidenz beträgt 4:100000 Kinder. Ein Häufigkeitsgipfel zeigt sich hierbei im Alter zwischen zwei und fünf Jahren.

Die genaue Ätiologie der ALL sowie die Ursache der Präferenz dieser Altersgruppe konnten bis heute nicht vollständig geklärt werden und bleiben Gegenstand der Forschung. Klar scheint zu sein, dass die Entstehung meist nicht monokausal verläuft und sowohl endogene als auch exogene Faktoren beteiligt sind (Inaba et al. 2013). Mittlerweile wird vermutet, dass die ALL in einem sogenannten „second hit“ (zweiten Treffer) als Folge einer fehlgeleiteten Immunantwort auf eine gewöhnliche Kinderkrankheit entsteht (Greaves 2006). Bezüglich dieser infektionsbasierten Annahme gibt es aktuell zwei Hypothesen: die „population mixing“-Hypothese (Kinlen 1988) und die der „delayed infection“ (Greaves 2006) (Inaba et al. 2013). Des Weiteren konnte anhand Überlebender der Atombombenabwürfe über Hiroshima und Nagasaki am Ende des 2. Weltkriegs ionisierende Strahlung (bis zu 200 mSv) als kausaler Faktor für die Entstehung von Leukämien postuliert werden (Preston et al. 1994). Dies kann jedoch bei minimalem Einsatz von ionisierender Strahlung in Schwangerschaft und Kindheit und einer natürlichen Strahlung von jährlich 3 mSv nicht als ursächlich für die kindliche ALL gesehen werden (Greaves 2006).

Auf Basis des zytomorphologischen Erscheinungsbildes wurde die ALL von der French-American-British (FAB) -Gruppe in die Subtypen L1 - L3 eingeteilt (Bennett et al. 1976). Anhand bestimmter Oberflächenantigene die mittels Durchflusszytometrie bestimmt werden, kann die ALL außerdem immunphänotypisch untergliedert werden. Neben der Einteilung in B- und T-Zelllinien-ALL werden daher je nach Differenzierungsgrad noch weitere Formen unterschieden (Bene et al. 1995)

Mithilfe moderner Studienprotokolle wie dem AIEOP-BFM ALL 2000 (Flohr et al. 2008) können heute je nach Autor 80 - 90 % der erkrankten Kinder (Bishop 2009, Inaba et al. 2013) langfristig geheilt werden. Obwohl die Überlebensraten in bestimmten Subgruppen mit deutlich erhöhtem Risiko (z.B. Säuglinge, Jugendliche sowie Patienten mit hohen Leukozytenzahlen, einem Induktionsversagen nach Tag 28 oder bestimmten Translokationen wie t(4;11) oder t(9;22)) immer noch erheblich niedriger sind, konnten, auch durch die HSZT, im Verlauf der letzten Jahrzehnte deutliche Fortschritte verzeichnet werden (Hunger et al. 2012).

2.1.2. Akute myeloische Leukämie

Die AML macht etwa 20 % aller kindlichen Leukämien aus. Die FAB-Klassifikation unterteilt sie anhand ihrer Zellmorphologie und ihrer Zytochemie in die Subgruppen M0 - M7 (Bennett et al. 1985a, Bennett et al. 1985b, Lee et al. 1987).

Allgemein anerkannte Faktoren für ein erhöhtes Risiko, an einer AML zu erkranken, sind vor allem genetische Syndrome wie Fanconi-Anämie, Bloom-Syndrom oder Ataxia teleangiectatica, die jedoch meist sehr seltene Erkrankungen darstellen. Den häufigsten genetischen Risikofaktor stellt das Down-Syndrom (Trisomie 21) dar (Puumala et al. 2013). Bei Kindern mit dieser Erkrankung tritt hauptsächlich der Subtyp M7 (akute Megakaryoblastenleukämie) auf und sie haben aufgrund eines guten Ansprechens auf die Chemotherapie eine bessere Prognose (Gamis 2005).

Die Ätiologie der AML bleibt trotz weiterer vermuteter Risikofaktoren jedoch unklar. Bekannt ist heute aber, dass verschiedene zytogenetische Veränderungen

mit einer unterschiedlich guten Prognose verbunden sind. Dies führte zu der Einteilung in Risikogruppen mit abweichenden Behandlungsstrategien (Manola 2009). Trotz einiger Kontroversen sind sich die meisten Autoren einig, dass Patienten mit den Translokationen t(8;21), t(15;17) sowie der Inversion inv(16) ein geringes Rezidivrisiko haben und daher in erster Remission nicht von einer Stammzelltransplantation profitieren. Hingegen haben Patienten mit einer Monosomie 5, 7 oder Deletion del(5q) sowie auch Patienten mit einem Nachweis von > 15 % Leukämiezellen nach der Induktionschemotherapie eine schlechtere Prognose (Niethammer et al. 2013). Eine HSZT kann hier Therapie der Wahl sein. Insgesamt hat sich die Prognose von Kindern mit AML in den letzten Jahrzehnten erheblich verbessert. Über 60 % erreichen heute eine langanhaltende Remission (Kaspers und Creutzig 2005). Mithilfe MRD-basierter Behandlungspläne soll die Prognose in Zukunft noch weiter verbessert werden.

2.1.3. Chronische myeloische Leukämie

Die CML ist bei Kindern relativ selten und macht nur 2 - 3 % aller Leukämien im Kindes- und Jugendalter aus. Ihre Inzidenz steigt dabei mit zunehmendem Alter. Obwohl sich jüngere Patienten teils mit abweichenden Befunden, wie höheren Leukozytenzahlen, präsentieren, kann bei Kindern und Jugendlichen, genau wie bei Erwachsenen, zumeist ein Philadelphia-Chromosom mit der Translokation t(9;22) und das Fusionsgen BCR-ABL nachgewiesen werden (Cwynarski et al. 2003, Millot et al. 2005).

Seit der Einführung des Tyrosin-Kinase-Inhibitors Imatinib hat sich die Prognose älterer Menschen mit CML deutlich verbessert. Und auch bei Kindern erzielt diese Therapie gute Ergebnisse. Allerdings ist sie wahrscheinlich nicht kurativ und die Medikamente müssen meist lebenslang eingenommen werden. Da Kinder eine erheblich längere verbleibende Lebenszeit haben, wird die dauerhafte Behandlung mit Imatinib trotz geringer Toxizität und Nebenwirkungen daher auch kritisch gesehen (Suttorp et al. 2011). Imatinib beeinflusst außerdem das Wachstum der Kinder negativ, da es sich neben einer Störung des Knochenwachstums auch auf die Wachstumshormonachse auswirkt (Ulmer et al. 2013). Die einzige kurative

Therapie bleibt daher voraussichtlich die HSZT, die insbesondere bei schlechtem Ansprechen auf die initiale Behandlung mit Tyrosin-Kinase-Inhibitoren empfohlen wird (Suttorp et al. 2011).

2.1.4. Myelodysplastische Syndrome und myeloproliferative Erkrankungen

MDS umfassen verschiedene Erkrankungen der hämatopoetischen Stammzelle. Sie sind gekennzeichnet von einer peripheren Zytopenie und einer Knochenmarkdysplasie in mindestens einer Zelllinie. Kindliche MDS unterscheiden sich in ihrem Auftreten (meist mehrere Zelllinien betroffen, andere Karyotypen) von MDS älterer Menschen und treten bei Kindern und Jugendlichen deutlich seltener auf (Taly Glaubach und Lisa J. Robinson 2014). Insgesamt machen MDS und myeloproliferative Erkrankungen im Kindesalter jeweils weniger als 5 % der malignen hämatologischen Erkrankungen aus (Hasle et al. 2003).

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) klassifiziert pädiatrische MDS anhand des prozentualen Blastenanteils in die am häufigsten auftretende refraktäre Zytopenie im Kindesalter (RCC) und high-grade MDS. Letztere lassen sich noch einmal unterteilen in die refraktäre Zytopenie mit Blastenvermehrung (RAEB) und die RAEB in Transformation (RAEB-T).

Eine den MDS nahestehende Gruppe stellen die myelodysplastischen/myeloproliferativen Neoplasien dar. Diese beinhalten neben der JMML auch die im Kindesalter extrem seltene chronische myelomonozytäre Leukämie (CMML) und die BCR-ABL-negative CML. Die JMML tritt ausschließlich bei sehr jungen Kindern auf und ist unter anderem durch eine Hepatosplenomegalie und ein erhöhtes fetales Hämoglobin gekennzeichnet (Dvorak und Loh 2014). Gemeinsam ist all diesen Krankheiten die HSZT als einzige kurative Therapie.

2.2. Hämatopoetische Stammzelltransplantation

Im Jahr 1959 wurde erstmals eine erfolgreiche syngene Transplantation von aus dem Knochenmark eines identischen Zwillings gewonnenen hämatopoetischen Stammzellen durchgeführt (Thomas et al. 1959). Doch aufgrund fehlender Kenntnis über immunologische Vorgänge, die z.B. die Graft-Versus-Host-Erkrankung

(GVHD) hervorrufen, sowie fehlende Behandlungsmöglichkeiten von Komplikationen wie Infektionen und Blutungen dauerte es noch einige Jahrzehnte bis die Stammzelltransplantation in die klinische Routine integriert werden konnte.

Generell besteht der Nutzen einer HSZT darin, ein nach myeloablativer Radio- oder Chemotherapie zerstörtes Immunsystem durch gesunde eigene oder fremde Stammzellen zu ersetzen. Im Falle einer allogenen Fremdspende wird der zusätzlich auftretende graft-versus-leukemia- (GVL) Effekt genutzt. Hierbei sollen überlebende bösartige Zellen durch die fremden immunkompetenten Zellen zerstört werden (Copelan 2006).

In Deutschland wurde erst 1975 das erste Kind mit einer allogenen Transplantation eines HLA-identischen Geschwisterspenders behandelt (Niethammer et al. 2013). Es litt an einer aplastischen Anämie. Im Laufe der Zeit kamen viele weitere Indikationen zur Behandlung maligner aber auch nicht maligner Erkrankungen, wie Immundefekte oder angeborene Stoffwechselerkrankungen dazu (Tabelle 1). Seitdem wurden Konditionierungsregime, Durchführung und die Behandlung von Komplikationen immer weiter verbessert, sodass eine bis heute steigende Anzahl von Kindern mithilfe aktueller Studienprotokolle (z.B. der Berlin-Frankfurt-Münster (BFM) Gruppe) geheilt werden können.

Tabelle 1

Maligne Erkrankungen mit Indikationen für eine allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (modifiziert nach Copelan et al. (Copelan 2006))
<ul style="list-style-type: none"> • Akute myeloische Leukämie • Akute lymphoblastische Leukämie • Chronische myeloische Leukämie • Myelodysplastische Syndrome • Myeloproliferative Erkrankungen • Non-Hodgkin-Lymphom • Hodgkin-Lymphom • Chronische lymphatische Leukämie • Multiples Myelom • Juvenile chronisch myeloische Leukämie (Anm.: heute juvenile myelo-monozytäre Leukämie)

2.2.1. Spendersuche und Stammzellquellen

Eine Stammzelltransplantation kann prinzipiell autolog, also durch Infusion eigener zuvor gesammelter Stammzellen, oder allogene, mithilfe der Stammzellen eines anderen Individuums erfolgen. Eine Sonderform stellt die schon erwähnte syngene Transplantation durch einen genetisch identischen Zwilling dar. Diese ist jedoch heute in der Praxis kaum von Relevanz, da hier genauso wie bei der autologen Transplantation ein zumeist gewünschter GVL-Effekt ausbleibt.

Bei der Auswahl eines geeigneten Spenders unterscheidet man zunächst zwischen HLA-identischen Geschwistern, die nur in 20 - 25 % vorhanden sind, und HLA-kompatiblen Fremdspendern (Niethammer et al. 2013). Die Überlebensraten unterscheiden sich dabei wenig (Horowitz 2012).

In jüngster Zeit können dank verbesserter Möglichkeiten der Immunsuppression auch haploidentische (nur zur Hälfte HLA übereinstimmende) Transplantationen mit beispielsweise elterlichen Stammzellen durchgeführt werden (Klingebiel 2003). Neben der Verwendung von aus dem Beckenknochen (Spina iliaca posterior) gewonnenen Knochenmark als Stammzellquelle (Buckner et al. 1984) hat sich

in den letzten Jahren zunehmend die Gewinnung von Stammzellen aus dem peripheren Blut durchgesetzt. Diese werden durch vorherige Gabe des Wachstumsfaktors G-CSF (granulocyte colony stimulating factor) aus dem Knochenmark mobilisiert und können so auf eine für den Spender weniger invasive Weise entnommen werden (Stem Cell Trialists' Collaborative 2005). Ebenfalls möglich ist die Nutzung von Nabelschnurvenenblut als Stammzellquelle, da hier keine HLA-Gleichheit vorliegen muss und dieses schnell zur Verfügung steht, wenn ein passender Spender fehlt (Gluckman 2000). Aufgrund des geringen Volumens und der längeren Rekonstitutionsdauer des Immunsystems wird von dieser Möglichkeit jedoch seltener Gebrauch gemacht (Copelan 2006).

Weiterhin werden HSZT anhand ihres Therapieregimes unterschieden. Eine Myeloablation soll das gesamte Knochenmark des Empfängers mit dem malignen Zellklon zerstören und außerdem eine Immunsuppression erzielen, die das Anwachsen der Spenderzellen erlaubt. Durch ein besseres Verständnis immunologischer Prozesse werden aber bei langsam fortschreitenden Erkrankungen und älteren Patienten auch zunehmend Regime mit reduzierter Intensität eingesetzt (Shi-Xia et al. 2011).

2.3. Minimale Resterkrankung

In der Therapie von malignen hämatologischen Erkrankungen spricht man bei Erreichen von $< 5\%$ Blasten morphologisch von einer kompletten Remission. Diese wird zunächst bei 80 - 90 % aller erkrankten Kinder erreicht. Jedoch ist dies keine Garantie, dass der entartete Zellklon zerstört und die Krankheit somit geheilt ist. Residuelle maligne Zellen können sich erneut vermehren und zu einem Rezidiv oder Progress führen. Man spricht hierbei von einer minimalen Resterkrankung (MRD).

Diese kann mit herkömmlichen morphologischen und zytogenetischen Methoden nicht erfasst werden. Quantitative molekulare Techniken können diese Zellen heute jedoch mit einer hohen Sensitivität erkennen (10^{-3} - 10^{-6}) (Justyna Jólkowska 2007, van der Velden et al. 2003). Das Ziel der Überwachung einer minimalen Resterkrankung ist es, auf ein drohendes Rezidiv möglichst frühzeitig

zu reagieren. Denn dieses ist, vor allem nach HSZT, mit einer sehr schlechten Prognose verbunden (van den Brink et al. 2010). So führt eine hohe MRD-Last, z.B. innerhalb von Studienprotokollen zur Behandlung der ALL, heute zu der Einteilung in eine Hoch-Risikogruppe mit intensiveren Therapieregimen. Patienten, bei denen keine MRD nachgewiesen werden kann, können hingegen eine mildere, nebenwirkungsärmere Chemotherapie erhalten. Für die Messung der MRD-Last hat sich bei Kindern mit ALL das Immunglobulin- (Ig) und T-Zellrezeptor- (TZR) Genrearrangement durchgesetzt (Flohr et al. 2008). Doch auch nach erfolgter HSZT ist die Kenntnis über die MRD-Last von immenser Bedeutung, da durch rechtzeitiges Eingreifen ein Rezidiv auf molekularer Ebene verhindert werden kann. Dies ist beispielsweise durch ein frühes Absetzen der Immunsuppression oder die Infusion von Spenderlymphozyten (DLI) möglich.

Geeignet scheint hierbei z.B. die Messung des Spenderchimärismus zu sein. So sollten nach Anwachsen des Transplantats 100 % Spenderzellen bei dem Patienten, also ein kompletter Spenderchimärismus (CC), nachweisbar sein. Ein MC mit dem Nachweis von autologen Empfängerzellen ist dabei mit einem erhöhten Rezidivrisiko verbunden. Doch die Sensitivität dieser Methode scheint begrenzt zu sein (Lange et al. 2011).

Des Weiteren wurde die Durchflusszytometrie als MRD-Marker evaluiert. Sie könnte trotz geringer Sensitivität (Sawada et al. 2009) für bestimmte Fragestellungen, speziell in Kombination mit anderen Markern, geeignet sein (Zhao et al. 2013).

Eine besondere Möglichkeit bietet sich bei Patienten, in deren Leukämiezellen ganz spezifische Fusionsgene gefunden werden können. Dies ist z.B. bei der CML oder Philadelphia-Chromosom-positiven akuten Leukämien mit der Translokation t(9;22) der Fall. Hier lässt sich das Fusionsgen BCR-ABL, welches sich hervorragend für den MRD-Nachweis eignet, PCR-technisch nachweisen. Auch bei Patienten mit AML konnten solche Fusionsgene in bestimmten Subgruppen gefunden werden. Beispiele hierfür sind PML-RARA, AML1-ETO und CBFB-MYH11. Bei Patienten, bei denen sich entweder diese Fusionsgene oder das sogenannte MLL-Rearrangement nachweisen lassen, können diese als hochspezifischer MRD-Marker eingesetzt werden (Kern et al. 2005). Leider sind solche

nur bei 40-50 % der Patienten mit AML vorhanden (Weisser et al. 2005), für alle anderen fehlen nach wie vor spezifische Marker. Vor allem bei diesen Patienten bietet sich der MRD-Nachweis mittels bei Leukämien universal überexprimierten Genen wie dem Wilms-Tumor-Gen 1 an.

2.3.1. Wilms-Tumor-Gen 1

Das Wilms-Tumor-Gen 1 (WT1) wurde erstmals 1990 von Call et al. isoliert (Call et al. 1990) und Mutationen als eine Ursache für die Entstehung des kindlichen Nephroblastoms (Wilms-Tumor) identifiziert. WT1 kodiert für einen Transkriptionsfaktor auf Chromosom 11p13, der mithilfe einer Zinkfingerdomäne Zellwachstum und Differenzierung beeinflusst (Sugiyama 2001). Hierbei scheint WT1 neben der Regulation der Transkription auch an der Prozessierung der RNA beteiligt zu sein (Scharnhorst et al. 2001) und dabei sowohl als Tumorsuppressor zu wirken, als auch onkogene Funktionen zu erfüllen (Yang et al. 2007).

Während in nur ca. 10 % der Wilms-Tumoren eine Mutation im WT1 gefunden werden konnte (Scharnhorst et al. 2001), wurden heterozygote Mutationen im WT1 in über 90 % der Fälle bei Patienten mit WAGR-, Denys-Drash-, und Frasier-Syndrom nachgewiesen (Little und Wells 1997). Gemeinsam ist diesen Syndromen das Auftreten von Fehlbildungen und Tumoren vor allem im Urogenitaltrakt, welche wohl auf die fehlende Funktion von WT1 zurückzuführen sind. In gesunden Zellen scheint die mRNA lediglich während der Embryonalentwicklung, in der Niere und in hämatopoetischen Stammzellen exprimiert zu werden. Allerdings konnte auch eine starke Überexpression in malignen hämatologischen Zellen und soliden Tumoren gezeigt werden (Yang et al. 2007). Ob WT1 als Tumorsuppressor oder Onkogen agiert, ist scheinbar abhängig vom Kontext und dem Differenzierungsgrad der Zellen. Während es in normalen hämatopoetischen Stammzellen ungehemmtes Wachstum unterdrückt, wirkt es onkogen in leukämischen Zellen (Yang et al. 2007).

Die Erkenntnis, dass WT1 bei akuten Leukämien überexprimiert ist, führte zu der Evaluation seiner Nützlichkeit als MRD-Marker (K Inoue und Nasu 1994). Seitdem wurden verschiedene Studien über die Bedeutung der WT1-Expression

zu verschiedenen Zeitpunkten maligner hämatologischer Erkrankungen durchgeführt. Die Ergebnisse unterschieden sich jedoch in Abhängigkeit von der angewendeten Methode, der Diagnose und auch dem Alter der Patienten. Bezüglich des Diagnosezeitpunkts beispielsweise fanden Trka et al. (Trka et al. 2002) einen negativen Einfluss der WT1-Expression auf die Prognose von Kindern mit AML, die Gaiger et al. (Gaiger et al. 1999) bei Kindern mit ALL nicht nachweisen konnten. Im Gegensatz dazu gibt es für die MRD-Überwachung im Verlauf der Erkrankung verschiedene Arbeiten, die einen Nutzen speziell bei der AML und auch MDS belegen (Bader et al. 2004a, Kern et al. 2005). Dabei wird der Einsatz bei der kindlichen ALL kontrovers beurteilt (Boublikova et al. 2006). In letzter Zeit wurde vermehrt der Verlauf der WT1-Genexpression bei Erwachsenen mit AML und MDS nach erfolgter HSZT untersucht. Auch hier schien WT1 mit einer negativen Prognose assoziiert zu sein (Wertheim und Bagg 2011, Zhao et al. 2012, Pozzi et al. 2013).

Nur eine Studie beschäftigte sich bisher mit dem prognostischen Einfluss von WT1 vor HSZT bei Kindern. Jacobsohn et al. (Jacobsohn et al. 2009) untersuchten hierbei allerdings ausschließlich Kinder mit AML. Generell zeigen die aktuellen Forschungsergebnisse einen besonderen Nutzen bei der AML, da WT1 hier bei über 90 % der Patienten überexprimiert ist.

Eine umfassende Bewertung von WT1 bei hämatologischen Erkrankungen im Kindesalter vor und nach HSZT steht nach wie vor aus. Deshalb soll in dieser Arbeit die Bedeutung der WT1-Genexpression als Marker residueller Leukämiezellen mithilfe von im Rahmen der HSZT gewonnenen Patientenproben aus peripherem Blut und Knochenmark untersucht werden. Hierbei gilt es zu zeigen, dass WT1 als universaler MRD-Marker für das frühzeitige Erkennen von Rezidiven nach HSZT geeignet ist.

2.3.2. Chimärismusanalyse

Die Analyse des Spenderchimärismus in peripherem Blut und Knochenmark des Empfängers mittels Short Tandem Repeat (STR) PCRs gehört heute zu einem Standardverfahren nach HSZT. Ein gemischter Spenderchimärismus (MC) kann

hierbei sowohl durch residuelle Leukämiezellen, als auch durch das Überleben normaler hämatopoetischer Zellen des Empfängers bedingt sein (Pulsipher et al. 2009). Diese wiederum stehen in Verdacht immunkompetente Spenderzellen und damit den GVL-Effekt zu hemmen (Roux et al. 1993, Roux et al. 1994). Diese Hypothese wird dadurch bekräftigt, dass vor allem zu Anfang ein MC meist durch normale hämatopoetische Empfängerzellen hervorgerufen wird. Dieser ist jedoch nicht zwingend mit einem Rezidiv assoziiert (Bader et al. 2000). Dennoch kann der Abstand zwischen MC-Anstieg und Auftreten eines Rezidivs sehr kurz sein. Patienten können dadurch dem Monitoring entgehen. Aufgrund der niedrigen Sensitivität von ungefähr einem Prozent und der Tatsache, dass der Chimärismus in erster Linie Informationen über das Anwachsen und die Toleranz des Transplantats gibt, schlussfolgern Bader et al., dass die Chimärismusanalyse lediglich als indirekter MRD-Marker gesehen werden darf (Bader et al. 2008). Deshalb wird empfohlen, den Spenderchimärismus bei akuten Leukämien als Prognosefaktor zu werten, um für eine Immuntherapie geeignete Patienten zu definieren (Bader et al. 2004c, Bader et al. 2004b). Für erwachsene Patienten und Kinder mit AML wurde außerdem eine höhere Sensitivität und Spezifität für bestimmte Zellpopulationen wie CD33+ und CD34+ Zellen beschrieben (Lange et al. 2011, Rettinger et al. 2011). Des Weiteren wird die Chimärismusanalyse verwendet, um ein Transplantatversagen zu diagnostizieren, und ist in dieser Eigenschaft anderen Markern überlegen, die direkt residuelle maligne Zellen nachweisen.

In der vorliegenden Arbeit soll daher die Nützlichkeit der Analyse des Chimärismus zur Rezidivvorhersage mit der der WT1-Expression verglichen werden.

3. Ziele der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss der WT1-Genexpression vor und nach HSZT auf das Auftreten eines Rezidivs, das Ereignis-freie- und das Gesamtüberleben der Patienten zu untersuchen. Dazu werden Patientenproben retrospektiv auf die Höhe der WT1-Expression untersucht. Diese Proben wurden zwischen 1992 und 2013 konsekutiv von Patienten der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Jena aus peripherem Blut und Knochenmark entnommen und anschließend kryokonserviert.

Hierbei sollen Aussagen über die Nützlichkeit von WT1 als MRD-Marker getroffen werden. Zu diesem Zweck beschäftigt sich die Arbeit einerseits mit dem prädiktiven Wert des WT1-Levels vor Beginn der Konditionierung auf das Auftreten eines Rezidivs nach Transplantation. Andererseits soll auch die Bedeutung steigender WT1-Werte nach Transplantation untersucht werden. Dabei gilt es herauszufinden, ob man ein drohendes Rezidiv auf molekularer Ebene anhand von WT1 erkennen kann und wie weit dies vor einem morphologischen Nachweis leukämischer Zellen möglich ist.

Des Weiteren soll die Nützlichkeit von WT1 als MRD-Marker krankheitsspezifisch und im Vergleich mit anderen möglichen Markern wie dem Chimärismus bewertet werden. Dazu wurden auch Daten des Instituts für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Jena, sowie in Studien gewonnene Daten der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Frankfurt verwendet.

4. Publierte Originalarbeiten

- 4.1. Prognostic impact of WT1 expression prior to hematopoietic stem cell transplantation in children with malignant hematological diseases. Woehlecke C, Wittig S, Arndt C, Gruhn B; Journal of Cancer Research and Clinical Oncology 2014 Sep 20. [Epub ahead of print]; DOI 10.1007/s00432-014-1832-y,**

Prognostic impact of WT1 expression prior to hematopoietic stem cell transplantation in children with malignant hematological diseases

Caroline Woehlecke · Susan Wittig · Clemens Arndt · Bernd Gruhn

Received: 26 July 2014 / Accepted: 9 September 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract

Purpose Malignant hematological diseases represent the most common pediatric cancer. As they cannot always be cured by chemotherapy alone, leukemia and myelodysplastic syndrome (MDS) are frequent medical indications for hematopoietic stem cell transplantation, yet even this treatment is not capable of preventing relapse for certain. Therefore, molecular markers are used to monitor minimal residual disease (MRD) to be enabled to react early to an impending relapse. As specific markers are not always available, Wilms' tumor gene 1 (WT1) has been suggested as a universal marker, but has not yet been established clinically.

Methods We determined the level of WT1 gene expression in 130 children, adolescents and young adults with malignant hematological diseases prior to transplantation and evaluated its impact on patients' outcome. A real-time quantitative RT-PCR was used for this purpose.

Results The relationship between a high level of WT1 and the cumulative incidence of relapse, event-free survival and overall survival proved to be highly significant in univariate and multivariate analyses. Forty-eight percent of all patients with high WT1 levels suffered from a relapse, whereas only eight percent showing normal WT1 levels before transplantation relapsed. The most convincing result was found for acute myeloid leukemia (AML) and MDS.

Conclusion We conclude that WT1 expression prior to transplantation qualifies as an independent prognostic factor and should be further evaluated for MRD monitoring. It might especially be useful for patients with AML or MDS missing specific markers.

Keywords Wilms' tumor gene 1 (WT1) expression · Minimal residual disease (MRD) · Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) · Acute myeloid leukemia (AML) · Myelodysplastic syndrome (MDS)

Introduction

Wilms' tumor gene 1 (WT1) is located at chromosome 11p13 and encodes a zinc finger transcription factor (Call et al. 1990) which has been shown to be important for cell growth and differentiation (Sugiyama 2001). It is overexpressed in both malignant hematological diseases and solid tumors (Sugiyama 2010). For this reason, several authors studied the usefulness of WT1 in evaluating minimal residual disease (MRD) of leukemia (Inoue et al. 1994) and other hematological diseases such as myelodysplastic syndromes (MDS) (Lange et al. 2011).

With increasing knowledge about the therapy of complications of hematopoietic stem cell transplantation (HSCT)—such as infections, graft-versus-host disease and veno-occlusive disease—relapse becomes a main reason for treatment failure. Therefore, it is essential to monitor the existence of residual leukemic cells to have the ability to react to an impending relapse as soon as possible. Immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements have proven to be a valid method for the evaluation of MRD in acute lymphoblastic leukemia (ALL) that can be applied in over 90 % of all children (Cazzaniga et al. 2003). In addition, MRD monitoring in chronic myeloid leukemia (CML) can be performed using the BCR-ABL transcripts, in this subgroup almost universally expressed. However, for acute myeloid leukemia (AML), specific markers such as fusion genes (e.g., AML1-ETO, CBFB-MYH11, PML-RARA and MLL rearrangements) have only been found in 40–50 %

C. Woehlecke · S. Wittig · C. Arndt · B. Gruhn (✉)
Department of Pediatrics, Jena University Hospital, Kochstr. 2,
07743 Jena, Germany
e-mail: bernd.gruhn@med.uni-jena.de

Table 1 Patients' characteristics

Characteristics	Number (n)
Total number of patients	130
Sex	
Male	76
Female	54
Age	
Median (range)	12.82 (0.88–26.22)
Diagnosis	
ALL	58
AML	40
MDS	26
CML	6
Source of stem cell transplant	
Bone marrow	89
Peripheral blood	40
Cord blood	1
Donor type	
Matched related	36
Matched unrelated	55
Mismatched/haploidentical	28
Autologous	11
T cell depletion	
Yes	18
No	112
Conditioning therapy	
Total body irradiation-based	51
Busulfan-based	65
Reduced intensity	14

ALL acute lymphoblastic leukemia, AML acute myeloid leukemia, MDS myelodysplastic syndrome CML chronic myeloid leukemia

of all patients (Weisser et al. 2005). Since WT1 is over-expressed in more than 90 % of AML, 70–90 % of ALL (Boublikova et al. 2006) and further increases with progression of disease in CML and MDS (Cilloni and Saglio 2004), it seems to be a reliable marker for measuring MRD in those entities and has been described to surpass other methods such as flow cytometry and chimerism (Kwon et al. 2012).

Nevertheless, the importance of WT1 in pediatric patients has been studied far less than in adults (Boublikova et al. 2006; Jacobsohn et al. 2009), even though leukemia represents the most frequent childhood malignant hematological disease. Especially, the state of research on WT1 in pediatric MDS and related diseases such as juvenile myelomonocytic leukemia (JMML) and chronic myelomonocytic leukemia (CMML) is pretty humble (Bader et al. 2004). Thus, this study includes all hematological malignancies likewise. It mainly focuses on the influence of the WT1 level before transplantation on patients' prognosis,

which, in contrast to the expression at diagnosis, where results vary depending on the author (Gaiger et al. 1999; Trka et al. 2002), has previously been identified as an independent factor for the patient's outcome (Jacobsohn et al. 2009; Valkova et al. 2013). To our knowledge, this work is the first to analyze the prognostic impact of pre-transplant WT1 in patients with ALL and MDS. On that account, we used both bone marrow and peripheral blood, to assess the usefulness of WT1 as a universal panleukemic marker.

Materials and methods

Patient samples

We investigated bone marrow and peripheral blood samples of 130 children, adolescents and young adults with different hematological diseases between the age of 9 months and 26 years (median age 12.8 years). Fifty-eight patients suffered from ALL, 40 patients from AML, six patients from CML, and 26 patients had MDS. For our calculations, we included patients with CMML and JMML which are classified as myelodysplastic/myeloproliferative diseases. Detailed patients' characteristics can be found in Table 1. All children received HSCT at the Department of Pediatrics of the Jena University Hospital, Germany, between November 1992 and December 2012.

Consent for study participation was obtained from all children or their parents depending on their legal age.

To be included in the study, the existence of a pre-transplant sample with sufficient intact RNA was necessary. Therefore, either a peripheral blood (PB) or a bone marrow (BM) sample was taken, approximately 2 weeks prior to transplantation, before the beginning of conditioning regimen. At that moment, 80 patients with acute leukemia were in complete remission (37 in first, 30 in second and nine in third complete remission). Twenty children did not reach complete remission before transplantation.

All patients with MDS were transplanted in their primary disease. Fourteen patients had refractory cytopenia of childhood (RCC) and five children advanced MDS [three patients with refractory anemia with excess of blast (RAEB) and two patients with RAEB in transformation (RAEB-T)]. All six individuals with CML were transplanted in the first chronic phase.

Measurement of WT1 gene expression

Both BM and PB samples were heparinized, and subsequently, the mononuclear cells were isolated using a Ficoll/Hypaque density gradient centrifugation. Afterward, the samples were cryopreserved in liquid nitrogen at -196°C .

RNA isolation

RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) was used for RNA isolation following the manufacturer's instructions.

Further, we added desoxyribonuclease from the Rnase-Free DNase Set (Qiagen) to avoid DNA contamination. RNA concentration was measured by spectrophotometry at 260 and 280 nm, and its purity was verified by their quotient.

cDNA synthesis

We employed 0.5 µg RNA and random hexamers in a volume of 20 µl for cDNA synthesis with Omniscript RT Kit (Qiagen).

Real-time quantitative RT-PCR

To evaluate any kind of aberrant RNA degradation, we used β 2-microglobulin (β 2 M) as a housekeeping gene and compared its expression to WT1.

A dilution of K562 cells was utilized to create a standard curve, whereat the β 2 M and WT1 concentration in 1 µl of undiluted K562 cDNA was arbitrarily defined as 1. Real-time quantitative PCR was performed by the use of ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany). The assay IDs were: β 2 M, Hs00187842_m1 and WT1, Hs00240913_m1. We applied 1 µl in a volume of 25 µl of cDNA and successively determined the levels of WT1 and β 2 M. For this purpose, the DNA was initially denatured for 10 min at 95 °C. The ensuing 40 cycles, respectively, started with DNA denaturation for 15 s at 95 °C, followed by annealing for 60 s at 60 °C.

Statistics

Statistical analysis was conducted with IBM SPSS Statistics version 21.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). Event-free survival (EFS) and overall survival (OS) were calculated using Kaplan–Meier curves. An event was defined as relapse/progression, a secondary malignancy or death. Differences between the two groups were compared with the log-rank test and a significance level of $p < 0.05$. For univariate and multivariate analyses, we used a Cox regression model. Cumulative incidences of relapse (CIR) were compared using Gray's k-sample test and R version 3.0.2 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Mann–Whitney U test was used to compare median expression levels of two groups.

Results

In a preliminary study, we examined the WT1 expression of 12 BM samples as well as 18 PB samples of healthy

donors who gave their approval in advance. Here, we found that normal PB, at least if not stimulated with G-CSF, does not contain any detectable WT1 expression, whereas there might be a low expression in BM due to regular hematopoietic stem cells that do express WT1 (Hosen et al. 2002). As we could not find any expression over 5×10^{-3} in healthy donor's samples, we determined 5×10^{-3} as our cutoff value for BM. Everything above that level or any clearly detectable expression ($>1 \times 10^{-4}$) in PB was defined as "high".

WT1 levels prior to transplantation

The samples were taken prior to the beginning of conditioning regimen, (median 13 days before transplantation). We quantified the values of 75 BM and 73 PB samples (from 18 patients, both were available). Out of all 130 patients, of whom at least one sample was analyzed, 56 showed a high WT1 expression and 74 patients had normal WT1 levels. We could find high values in just 31 % of ALL patients but in 58 % of children with AML.

Since we included patients who did not reach complete remission, we compared the WT1 mRNA expression of these 20 children with those 76 children transplanted in complete remission. As expected, we found the median WT1 levels to be significantly higher, when the patients did not reach remission ($p < 0.0001$). For this purpose, we analyzed BM and PB samples separately. Patients in remission had a median expression of 0 in BM (maximum 0.049) and PB (maximum 0.026), whereas patients not reaching remission had a median WT1 expression of 0.0461 (range 0–0.86) in BM and 0.0045 (range 0–0.97) in PB. Interestingly, the median WT1 expression in the no-remission group in PB was approximately a tenth (0.098) of the expression in BM. As described by other authors before, the amount of patients with high WT1 levels seemed to increase with progression of disease in MDS (Cilloni et al. 2003; Tamaki et al. 1999). Thus, 12 out of 14 children with refractory cytopenia had a low WT1 expression, whereas all five children with advanced MDS (RAEB or RAEB-T) showed high WT1 levels.

Impact on clinical outcome

According to the respective treatment protocol, all patients received a conditioning regimen with either total body irradiation or busulfan or reduced intensity before transplantation.

Follow-up time was 5 years after transplantation or until the reference date August 31, 2013. During this period, 33 children (25.4 %) suffered from a relapse or progression of diseases and 47 children ultimately died due to relapse or other reasons such as infections, graft-versus-host disease

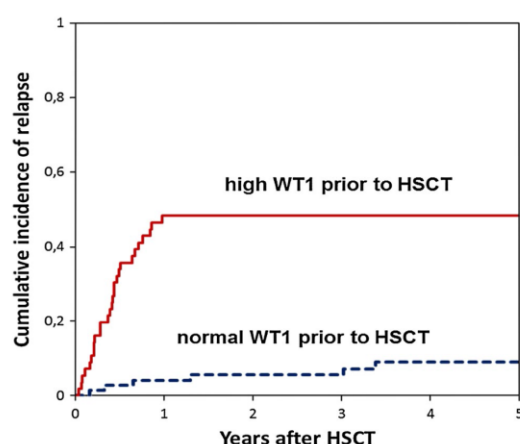


Fig. 1 Cumulative incidence of relapse of 130 children with malignant hematological diseases stratified by WT1 expression before transplantation (high, $n = 56$; normal, $n = 74$; $p < 0.0001$)

or multiple organ failures. Besides, three children had a graft rejection.

We performed univariate analysis regarding the influence of pre-transplant WT1 on clinical outcome parameters such as CIR, five-year EFS and five-year OS and found the differences between high and normal WT1 to be highly significant (Figs. 1, 2, 3). Whereas 48 % of patients with high levels relapsed during follow-up time, only 8 % did in the other group. The differences in the EFS and OS were similarly unambiguous. While 66 % (37 out of 56) had an event and 61 % (34 out of 56) died in the high-risk group, just 18 % of children (13 out of 74) had an event in the low-risk group. Though, only six of those 13 children died after suffering from a leukemic relapses. The remaining seven patients died due to other causes.

In addition, we analyzed the three most common diseases, ALL, AML and MDS, separately. Here, we found significant results for ALL in the EFS, but could only ascertain a trend for CIR and OS.

AML

More persuasive were the results of the 40 patients with AML as shown in Figs. 4, 5. In this subgroup, 17 patients had a normal WT1 level and 23 patients showed high WT1 levels before HSCT. Out of these 23 patients, 17 relapsed (74 %). However, just one person with low levels suffered from a relapse which occurred almost three and half years after transplantation. Now, the patient is in remission again after receiving a second transplant. Concerning the survival, we found that 87 % of children (20 out of 23) with high WT1 levels had an adverse event and 78 % of them

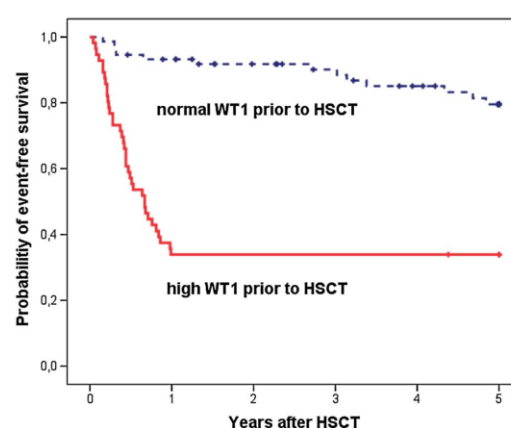


Fig. 2 Event-free survival of 130 children with malignant hematological diseases stratified by WT1 expression before transplantation; $p < 0.0001$

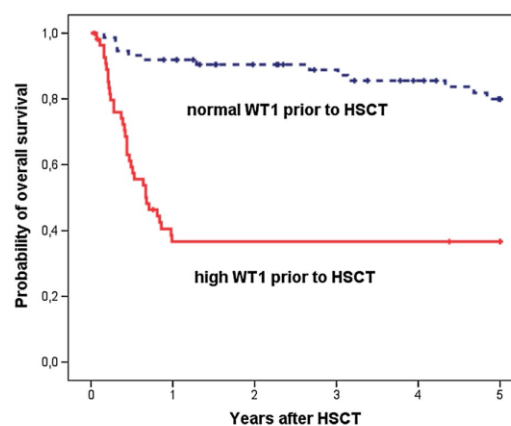


Fig. 3 Overall survival of 130 children with malignant hematological diseases stratified by WT1 expression before transplantation; $p < 0.0001$

(18 out of 23) died. But only 18 % of patients (3 out of 17) with normal levels had an event. One event was the survived relapse, and the other two events were deaths due to other reasons.

MDS

We also performed a separate analysis of the 26 patients with MDS (Figs. 6, 7). Of these children, 14 had low WT1 levels and none of them got a relapse. One patient died due to an infection that occurred almost 5 years after receiving

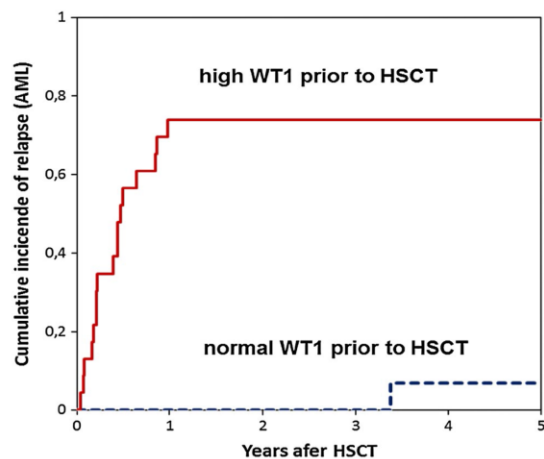


Fig. 4 Cumulative incidence of relapse of 40 patients with acute myeloid leukemia stratified by WT1 status prior to HSCT (high, $n = 23$; normal, $n = 17$; $p < 0.0001$)

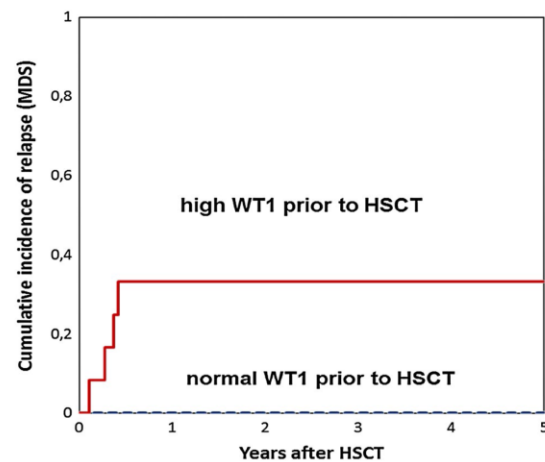


Fig. 6 Cumulative incidence of relapse of 26 patients with myelodysplastic syndrome stratified by WT1 status before HSCT (high, $n = 12$; normal, $n = 14$; $p = 0.022$)

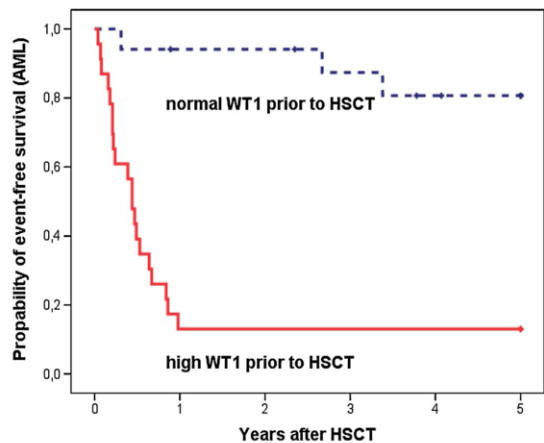


Fig. 5 Event-free survival of 40 patients with acute myeloid leukemia. Kaplan-Meier curves depending on WT1 prior to HSCT; $p < 0.0001$

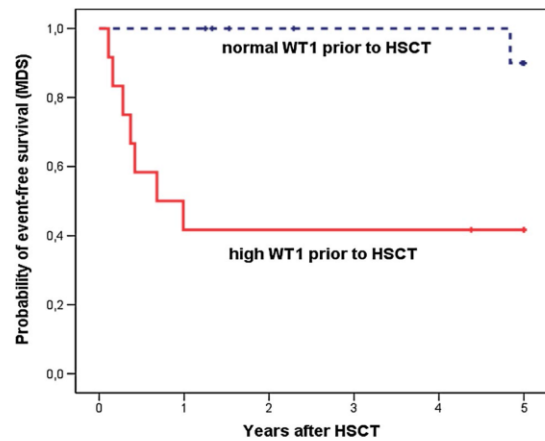


Fig. 7 Event-free survival of 26 patients with MDS. Kaplan-Meier curves depending on WT1 before HSCT; $p = 0.003$

the transplant. Out of those 12 children with elevated levels, four suffered from a recurrence of underlying disease and seven died during follow-up period.

Univariate and multivariate analyses

To further evaluate any influences on the outcome, we performed univariate and multivariate analyses of parameters that might affect our results. We took into account the appearance of acute graft-versus-host disease (GVHD) grade II–IV or chronic GVHD, as well as donor type

(identical vs. not identical) and disease risk (low vs. high). The conditions of MDS in refractory cytopenia, leukemia in first or second complete remission and CML in chronic phase defined a low disease risk, whereas leukemia in relapse or beyond second remission, advanced MDS, JMML as well as every second transplantation accounted for a high risk of disease.

Patients showing high values of WT1 were six times more likely to relapse and had a fivefold risk of dying ($p < 0.0001$) in univariate analysis. Beside these highly significant results, we also found the impact of disease risk on CIR, EFS and OS to be significant in univariate analyses

Table 2 Univariate and multivariate analyses of risk factors for event-free survival

Risk Factor	Univariate analyses		Multivariate analyses	
	HR (95 % CI)	<i>p</i>	HR (95 % CI)	<i>p</i>
WT1 (above normal)	5.866 (3.104–11.087)	<0.0001	4.755 (2.318–9.755)	<0.0001
Acute GVHD (II–IV)	1.860 (1.060–3.263)	0.031		ns
Chronic GVHD		ns		ns
Donor type (not identical)		ns		ns
Disease risk (high)	3.737 (2.124–6.575)	<0.0001		ns

GVHD graft-versus-host disease, *ns* no significance

Disease risk being defined as follows

High = transplanted in relapse or > second remission; second transplantation; advanced MDS

Low = refractory cytopenia; first or second complete remission; CML in chronic phase

(see Table 2). The appearance of acute GVHD (II–IV) also proved to significantly affect the EFS and OS, but not the CIR. However, there was no impact of chronic GVHD or donor type on patients' outcome after HSCT.

In multivariate analysis, the only variable whose impact remained highly significant in CIR, EFS and OS was a high WT1 expression prior to transplantation. The only other variable that proved to be significant in multivariate analysis was acute GVHD which seemed to have a negative influence on the OS ($p = 0.011$).

Discussion

Plenty of studies has investigated and confirmed the importance of quantifying MRD during treatment of all malignant hematological diseases. This retrospective study was able to prove a definite association between the level of WT1 gene expression before HSCT and clinical outcome. Even though the usefulness of WT1 as a panleukemic marker has been described various times, it still could not find a way into everyday clinical practice. One of the possible reasons might be the differences in the performed methods. Since this trial was a single-center study carried out over an extended period, we retained the method established by Ogawa et al. (2003) and received highly significant results. However, it might be reasonable to standardize one method for all further research for studies to be better comparable. The separate analysis of the different malignancies helped to further evaluate the clinical significance of our work. WT1 is useful as a pre-transplant prognostic marker for all malignant hematological diseases, but works even better in AML, where it is widely expressed and MDS, where its expression rises with progression of disease (Tamaki et al. 1999). As CML only occurs rarely in childhood, our numbers of CML patients were too low to make a clear statement. Also about 90 % of CML patients

express the BCR-ABL transcript which can be easily used as MRD marker. Likewise, our results for ALL were not always a distinct as for AML and MDS which has been described in the literature before (Boublikova et al. 2006; Cilloni and Saglio 2004). Nevertheless, sufficient methods (immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements) are already available and might be better applicable than a measurement of WT1 gene expression. But we could ascertain the importance of WT1 as a prognostic marker before HSCT in patients with AML, especially, if a more specific marker is unavailable, as it is the case in about 60 % of patients (Weisser et al. 2005). To our knowledge, we present the first data about the influence of pre-transplant WT1 in childhood MDS, and we were able to prove that in MDS, too, high levels are associated with a poor outcome.

One might criticize our inclusion of children transplanted despite the morphological evidence of leukemic cells, because of the missing need to verify MRD in this case. But we were able to prove that almost 90 % of those children had elevated WT1 levels as well. Here, WT1 can still be useful for post-transplant MRD monitoring. Aside from that, the prognostic impact of the WT1 expression should lead to further modification of therapy procedures. For instance, conditioning regimen could be adjusted depending on burden of MRD. After transplantation, both early withdrawal of immunosuppressants and infusion of donor lymphocytes can result in an intensified graft-versus-leukemia effect. In addition, it might be reasonable to continuously monitor WT1 expression levels in order to react to an impending relapse, preferably at a molecular level.

This study also confirmed that BM and PB were equally useful for our purpose. The simultaneous application of both specimens even simplifies this method.

Several authors compared MRD monitoring by WT1 expression to other methods such as flow cytometry (Rossi et al. 2012). Some even suggested a combination of both (Zhao et al. 2013). However, a comparison of the

prognostic impact of those parameters is still pending. Further research will help to specify the application of prognostic markers such as WT1 for decisions on pre-transplant conditioning and post-transplant monitoring and treatment.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical standard All procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional and national) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2008. Informed consent was obtained from all patients for being included in the study.

References

- Bader P et al (2004) WT1 gene expression: useful marker for minimal residual disease in childhood myelodysplastic syndromes and juvenile myelo-monocytic leukemia? *Eur J Haematol* 73:25–28. doi:10.1111/j.1600-0609.2004.00260.x
- Boublikova L et al (2006) Wilms' tumor gene 1 (WT1) expression in childhood acute lymphoblastic leukemia: a wide range of WT1 expression levels, its impact on prognosis and minimal residual disease monitoring. *Leukemia* 20:254–263. doi:10.1038/sj.leu.2404047
- Call KM et al (1990) Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell* 60:509–520
- Cazzaniga G, dA E, Corral L, Biondi A (2003) Results of minimal residual disease (MRD) evaluation and MRD-based treatment stratification in childhood ALL. *Best pract res Clin haematol* 15:623–638
- Cilloni D, Saglio G (2004) WT1 as a universal marker for minimal residual disease detection and quantification in myeloid leukemias and in myelodysplastic syndrome. *Acta Haematol* 112:79–84. doi:10.1159/000077562
- Cilloni D et al (2003) Significant correlation between the degree of WT1 expression and the International Prognostic Scoring System Score in patients with myelodysplastic syndromes. *J clin oncol: Off J American Soc Clin Oncol* 21:1988–1995. doi:10.1200/JCO.2003.10.503
- Gaiger A et al (1999) Wilms' tumour gene (wt1) expression at diagnosis has no prognostic relevance in childhood acute lymphoblastic leukaemia treated by an intensive chemotherapy protocol. *Eur J Haematol* 63:86–93
- Hosen N et al (2002) Very low frequencies of human normal CD34 + haematopoietic progenitor cells express the Wilms' tumour gene WT1 at levels similar to those in leukaemia cells. *Br J Haematol* 116:409–420
- Inoue K, Sugiyama H, Ogawa H, Nakagawa M, Yamagami T, Miwa H et al (1994) WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood* 84(9):3071–3079
- Jacobsohn DA et al (2009) High WT1 gene expression before haematopoietic stem cell transplant in children with acute myeloid leukaemia predicts poor event-free survival. *Br J Haematol* 146:669–674. doi:10.1111/j.1365-2141.2009.07770.x
- Kwon M et al (2012) Evaluation of minimal residual disease by real-time quantitative PCR of Wilms' tumor 1 expression in patients with acute myelogenous leukemia after allogeneic stem cell transplantation: correlation with flow cytometry and chimerism. *Biol Blood Marrow Transplant: J Am Soc Blood Marrow Transplantation* 18:1235–1242. doi:10.1016/j.bbmt.2012.01.012
- Lange T et al (2011) Monitoring of WT1 expression in PB and CD34(+) donor chimerism of BM predicts early relapse in AML and MDS patients after hematopoietic cell transplantation with reduced-intensity conditioning. *Leukemia* 25:498–505. doi:10.1038/leu.2010.283
- Ogawa H et al (2003) The usefulness of monitoring WT1 gene transcripts for the prediction and management of relapse following allogeneic stem cell transplantation in acute type leukemia. *Blood* 101:1698–1704. doi:10.1182/blood-2002-06-1831
- Rossi G et al (2012) Comparison between multiparameter flow cytometry and WT1-RNA quantification in monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukemia without specific molecular targets. *Leuk Res* 36:401–406. doi:10.1016/j.leukres.2011.11.020
- Sugiyama H (2001) Wilms' tumor gene WT1: its oncogenic function and clinical application. *Int J Hematol* 73:177–187
- Sugiyama H (2010) WT1 (Wilms' tumor gene 1): biology and cancer immunotherapy. *Jpn J Clin Oncol* 40:377–387. doi:10.1093/jjco/hyp194
- Tamaki H et al (1999) The Wilms' tumor gene WT1 is a good marker for diagnosis of disease progression of myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 13:393–399
- Trka J et al (2002) Real-time quantitative PCR detection of WT1 gene expression in children with AML: prognostic significance, correlation with disease status and residual disease detection by flow cytometry. *Leukemia* 16:1381–1389. doi:10.1038/sj.leu.2402512
- Valkova V et al (2013) Minimal residual disease detectable by quantitative assessment of WT1 gene before allogeneic stem cell transplantation in patients in first remission of acute myeloid leukemia has an impact on their future prognosis. *Clin Transplant* 27:E21–29. doi:10.1111/ctr.12046
- Weisser M, Kern W, Rauhut S, Schoch C, Hiddemann W, Haferlach T, Schnittger S (2005) Prognostic impact of RT-PCR-based quantification of WT1 gene expression during MRD monitoring of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 19:1416–1423. doi:10.1038/sj.leu.2403809
- Zhao XS et al (2013) Combined use of WT1 and flow cytometry monitoring can promote sensitivity of predicting relapse after allogeneic HSCT without affecting specificity. *Ann Hematol* 92:1111–1119. doi:10.1007/s00277-013-1733-1

- 4.2. Detection of relapse after hematopoietic stem cell transplantation in childhood by monitoring of WT1 expression and chimerism, Woehlecke C, Wittig S, Sanft J, Kreyenberg H, Gruhn B; Journal of Cancer Research and Clinical Oncology 2015 Jan 24; [Epub ahead of print]; DOI 10.1007/s00432-015-1919-0**

Detection of relapse after hematopoietic stem cell transplantation in childhood by monitoring of WT1 expression and chimerism

Caroline Woehlecke · Susan Wittig · Juliane Sanft ·
Hermann Kreyenberg · Bernd Gruhn

Received: 1 December 2014 / Accepted: 12 January 2015
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Abstract

Purpose The measurement of minimal residual disease after hematopoietic stem cell transplantation is crucial for the prevention of hematological relapses. But many methods are limited to certain groups of patients. We present a comparison of two markers which are universally applicable: WT1 expression and chimerism status.

Methods We analyzed 1,848 peripheral blood and bone marrow samples of 148 children, adolescents and young adults with malignant hematological diseases. Median follow-up time was 739 days after transplantation.

Results All patients suffering from hematological relapse showed high WT1 levels. Approximately half (51 %) of the 37 relapses could have been detected early through an increase in WT1 expression. WT1 kinetics revealed to be more specific than single elevated WT1 levels ($p < 0.05$) and chimerism analysis ($p < 0.05$). Combined with chimerism analysis, 74 % of relapses were detectable in advance. Elevated WT1 expression levels after transplantation reached the highest sensitivity (64.9 %) as a single marker, although differences were not significant. When the dynamics of both markers as well as any elevated WT1

expression were taken into account, a sensitivity of 81.5 % and a specificity of 83.7 % were obtained.

Conclusions Hence, we conclude that WT1 is a useful marker for monitoring of minimal residual disease after transplantation, if specific targets are not available. WT1 expression and chimerism status should be mutually evaluated to decide about immunotherapeutic interventions aimed at preventing morphological relapse.

Keywords WT1 expression · Minimal residual disease (MRD) · Chimerism · Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) · Acute myeloid leukemia (AML) · Myelodysplastic syndrome (MDS)

Introduction


Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is regarded as a potentially curative treatment for children, adolescents and young adults with high-risk malignant hematological diseases. Even though the overall survival of patients has considerably improved during the last decades, relapse after transplantation is still associated with a poor prognosis and remains the main reason for treatment failure. Therefore, it is crucial to monitor the existence of residual malignant cells, which cannot be detected by morphological methods (Justyna Jólowska and Dawidowska 2007). Their evidence can lead to immunological interventions like withdrawal of immunosuppressants or donor lymphocyte infusion that can prevent a manifest hematological relapse (Collins et al. 1997). Different approaches for the measurement of minimal residual disease (MRD) after HSCT have been proposed and evaluated for adults (Christopeit et al. 2014) and children (Bader et al. 2008).

C. Woehlecke · S. Wittig · B. Gruhn (✉)
Department of Pediatrics, Jena University Hospital, Kochstr. 2,
07745 Jena, Germany
e-mail: Bernd.Gruhn@med.uni-jena.de

J. Sanft
Institute for Forensic Medicine, Jena University Hospital, Jena,
Germany

H. Kreyenberg
Division for Stem Cell Transplantation and Immunology,
Department for Children and Adolescents, University Hospital,
Goethe University, Frankfurt am Main, Germany

Published online: 24 January 2015

 Springer

However, many methods are limited to certain groups of patients exhibiting specific features. For example, immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements can only be applied in children with acute lymphoblastic leukemia (ALL), just as the BCR–ABL fusion gene can only be used for patients with chronic myeloid leukemia (CML) and Philadelphia chromosome-positive acute leukemia. Unfortunately, most patients with acute myeloid leukemia (AML) and myelodysplastic syndromes (MDS) lack a specific marker (Bader et al. 2004b; Willasch et al. 2009). Interestingly, Wilms tumor gene 1 (WT1) is overexpressed in 89–100 % of patients with AML and MDS (Lange et al. 2011). Also, WT1 expression before transplantation has previously been proven to have a prognostic impact on the outcome of children with AML (Jacobsohn et al. 2009; Woehlecke et al. 2014). The significance of WT1 monitoring for the early detection of relapse in childhood hematological malignancies has been reported controversially (Boublikova et al. 2006; Elmaagacli et al. 2000; Kletzel et al. 2002), and no consensus has yet been found. Another possibility for the assessment of post-transplant relapse probability is the quantification of donor chimerism (Bader et al. 1996). The appearance of a mixed chimerism is not only associated with graft failure but may also precede a hematological relapse due to a reduced graft-versus-leukemia (GVL) effect (Roux et al. 1994). Nonetheless, the sensitivity of this method seems to be restricted (Lange et al. 2011).

The aim of this study was to analyze the WT1 gene expression of 148 children, adolescents and young adults after HSCT and to evaluate its predictive value on the occurrence of hematological relapse. Furthermore, we investigated the dynamics of an increase in WT1 expression levels before the morphological evidence of leukemic blasts and if WT1 is superior to chimerism analysis regarding relapse detection. Although plenty of studies concerning relapse assessment after HSCT in adult patients do already exist, those including children mainly focus on MRD monitoring during chemotherapy and children with ALL (Justyna Jólkowska and Dawidowska 2007). Nevertheless, an overexpression of WT1 has also been shown for children with AML, MDS and juvenile myelomonocytic leukemia (JMML) (Bader et al. 2004b; Jacobsohn et al. 2009). We present a single-center analysis of all hematological malignancies in childhood (ALL, AML, CML, JMML and MDS) with special regard to AML, MDS and JMML as they are still missing specific markers for MRD monitoring.

Methods

Patient samples

One hundred and forty-eight patients who received a HSCT at Jena University Hospital were consecutively enrolled in

Table 1 Patient characteristics

Characteristics	Number (n)
Total number of patients	148
Sex	
Male	88
Female	60
Age (years)	
Median (range)	12.4 (0.62–26.22)
Follow-up (overall)	
Median (range)	738 days (29–4,649 days)
Number of samples (per patient)	
Median (range)	12 (3–28)
Number of samples (overall)	1,884
Diagnosis	
ALL	68
AML	45
MDS	21
CML	7
JMML	7
Source of stem cell transplant	
Bone marrow	101
Peripheral blood	46
Cord blood	1
Donor type	
Matched related	44
Matched unrelated	64
Mismatched/haploidentical	28
Autologous	12
T cell depletion	
Yes	21
No	127
Conditioning therapy	
Busulfan based	74
Total body irradiation based	62
Reduced intensity	12

our study. Informed consent was obtained from all participants or their legal guardians. The study was approved by the Institutional Review Board of the Medical Faculty of the University of Jena (4076-05/14).

Patients presented with the following diagnosis: 68 patients with ALL, 45 patients with AML, 21 patients with MDS, seven patients with CML and seven patients with JMML. Detailed patient characteristics can be found in Table 1. We deliberately included patients with different diagnoses, remission status and conditioning regimen to prove an overall usefulness of WT1 for the detection of residual malignant cells. After transplantation, WT1 gene expression was used for MRD monitoring. The day of transplantation was defined as day 0. Continuously, we

took bone marrow (BM) samples on days 30, 60, 100 and 360 and additional peripheral blood (PB) samples from day 30 through 1,080 in regular intervals. Preferably, they were taken monthly during the first year, the second year every other month and the third year every third month. If necessary for MRD monitoring, additional samples were obtained. Follow-up time covered a median period of 739 days (range 30–4,649 days). Overall, we determined the WT1 gene expression in 1,848 samples. On average, 12 samples per patient (range 3–28) were measured. In order to receive meaningful results, we only included patients of whom at least three samples after transplantation were available. PB and BM samples were treated equally in this analysis, merely using different cutoffs to differentiate between elevated and normal WT1 levels. As PB is easier to collect from the patient, we analyzed 1,323 PB samples (72 %) and 525 BM samples (28 %).

Detection of WT1 expression by real-time quantitative RT-PCR

As described recently by Woehlecke et al. (2014), WT1 expression was measured in previously cryopreserved PB or BM samples. For this purpose, RNA was isolated using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Desoxyribonuclease from the RNase-free DNase set (Qiagen) was applied to prevent DNA contamination. RNA was quantified spectrophotometrically. cDNA synthesis was performed with Omniscript RT Kit (Qiagen). Subsequently, cDNA was measured by real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) using the ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany). A standard curve was created from K562 cells, a leukemic cell line with an ascertained WT1 overexpression. To allow for a varying degree of RNA degradation, WT1 was also put into relation to the housekeeping gene β 2-microglobulin (β 2 M).

Chimerism analysis

As described by Bader et al. (2004a), we applied a PCR of short tandem repeats (STR) for the analysis of donor chimerism in PB and BM. This method has initially been established for forensic analyses and therefore has been conducted by the Institute of Forensic Medicine. For this purpose, DNA was isolated from patients' specimen and analyzed by a semiquantitative PCR method.

Statistics

IBM SPSS statistics version 21.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) was used for statistical analyses. Spearman's coefficient was employed to correlate WT1 expression

levels in BM and PB. Fishers' exact test was used to calculate differences between two groups. Mann–Whitney *U* test was used to compare medians. Sensitivity of WT1 and chimerism was compared with McNemar test. A regression model was applied to combine two or more markers.

Results

WT1 levels after transplantation

A preliminary study on healthy volunteers was performed to define cutoff levels for the differentiation between elevated WT1 levels and normal WT1 expression that might be found in healthy BM due to regular hematopoiesis. Aside from an expression above 5×10^{-3} , which was not found in healthy donors, we especially considered increasing WT1 levels after transplantation as meaningful. In PB, WT1 was mostly not detectable. As confirmed in a previous study (Woehlecke et al. 2014), the expression of WT1 in PB has been described to be one tenth of the expression in BM (Inoue et al. 1996). This can be explained by a background expression of WT1 in BM and might lead to a higher sensitivity of PB for the detection of residual malignant cells. Thus, we defined any expression above 5×10^{-4} as elevated in PB. Here, again an emphasis was put on the kinetics of WT1 expression. In this analysis, we found the relation between WT1 expression in PB and BM to be approximately 1:9 (Fig. 1).

Of the 148 included patients, 111 (75 %) did not suffer from a relapse of disease. They achieved either a long-term remission after HSCT (79 %) or died due to other reasons than relapse (21 %). None of them showed any increase in WT1 during monitoring except for two children with a molecular relapse (see below). However, a group of five patients showed elevated levels immediately after transplantation which decreased over time. Four of these patients already showed elevated WT1 levels directly before transplantation. Immunologic phenomena like the graft-versus-leukemia effect are likely to explain this decrease. Also, nine patients presented with a nonrecurring elevated WT1 expression in PB or BM. Repeated analyses however could not confirm an increase.

In contrast, all 37 (25 %) patients suffering from a hematological relapse after HSCT presented with high WT1 levels at the time point of relapse ($p < 0.0001$). Though, relapse of three patients whose WT1 expression was elevated but did not reach the cutoff for BM could only be detected by WT1 analyses in PB. Relapse occurred at a median of 161 days (range 25–1,234 days) after transplantation. Only two girls of this group were able to survive long term after a second transplantation. All other patients ultimately died due to relapse or related complications.

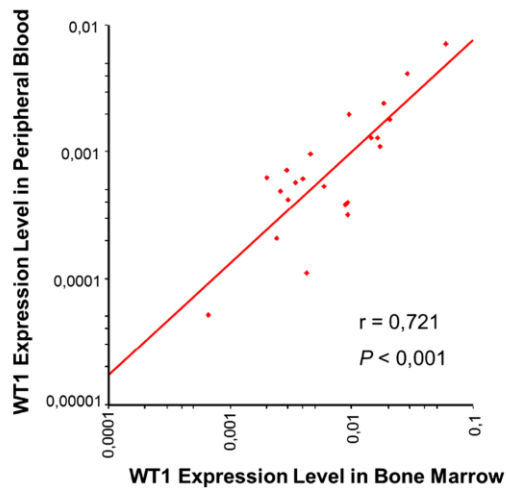


Fig. 1 Correlation between WT1 gene expression in bone marrow and peripheral blood in 22 samples that were obtained on the same day. The WT1 levels in peripheral blood appeared to be approximately one-ninth of those found in bone marrow. Spearman's correlation coefficient $r = 0.721$

Increasing WT1 levels before relapse

Through monitoring of WT1 gene expression, we were able to demonstrate an increase in WT1 in 51 % (19/37) of patients with a hematological relapse. This increase was detectable at a median of 26 days before the morphological evidence of leukemic cells. As shown in Figs. 2, 3, this increase proceeded either gradually or rapidly. These 19 elevated WT1 levels were detected in PB in 14 cases, in BM in one case and in four patients simultaneously in PB and BM. We could not find an increase in WT1 in the remaining 18 patients. Table 2 displays the number of patients whose relapse could be detected in advance either through single elevated or increasing WT1 levels. It also shows the amount of patients who presented with elevated WT1 levels although they stayed in remission.

Interestingly, in those 18 relapsed patients without an increase in WT1, the last sample before relapse was taken considerably earlier, median 71 days before relapse. Thus, the interval was significantly longer ($p = 0.016$) and probably too long to detect an increase in WT1 in those patients. Furthermore, we were able to diagnose an impending hematological relapse at a molecular level by analysis of WT1 expression in two cases. As shown in Figs. 4, 5, in these two children, a hematological relapse was prevented by immunological interventions. Both patients were transplanted because of relapsed AML and a long-term remission could be

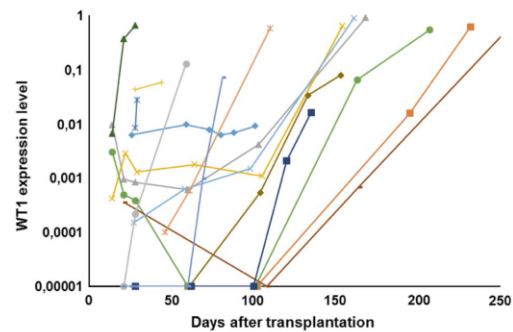


Fig. 2 Increasing WT1 levels before hematological relapse. Monitored in peripheral blood of 15 patients with malignant hematological diseases

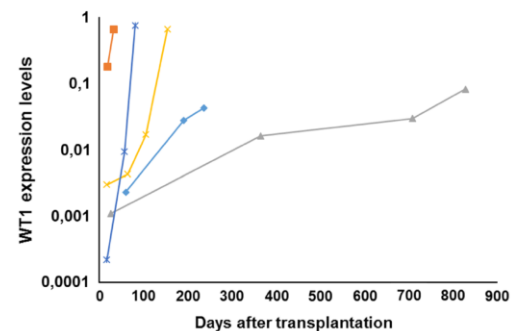


Fig. 3 Increasing WT1 levels before hematological relapse. Monitored in bone marrow of four patients with malignant hematological diseases

achieved by withdrawal of immunosuppression (cyclosporine) and by donor lymphocyte infusion, respectively. More than 10 years later, both patients are alive and can be considered as cured. These two children were excluded from further analyses as hematological relapse was averted by intervention.

Separate analyses of the respective diseases revealed that all three relapses of children with JMML as well as the only recurrence of underlying disease of a patient with MDS could be detected through an increasing WT1 expression. Fifty-three percent (9/17) of AML patients showed elevated levels immediately before morphological relapse, and two more patients presented with an overexpression after HSCT. Only 40 % (6/15) of ALL relapses could be identified in advance. The only CML relapse showed an elevated WT1 expression after transplantation, but no increase before relapse.

Comparison of WT1 and donor chimerism

If additional DNA was available, an analysis of hematopoietic chimerism was performed by a STR PCR. Such

Table 2 Differentiation between relapse and remission with different MRD markers

	Relapse	Remission	Total
<i>WT1</i>			
Increase in WT1 level	19	0	19
Any elevated WT1 expression	24	9	33
Total number of patients	37	109	146
<i>Chimerism</i>			
Increasing mixed chimerism	9	15	24
Any mixed chimerism	16	31	47
Total number of patients	27	84	111

an analysis could be performed for 50 % of all samples in which WT1 expression was determined. It was also possible for 27 of the 37 patients with a hematological relapse. In 15 of 27 patients (56 %), a mixed donor chimerism (MC) was found in advance of relapse. Accordingly, 12 patients presented with a complete donor chimerism (CC), and for 10 patients, no samples were available. The increase in MC was seen median 15 days (range 5–177) before relapse. Table 2 shows the number of patients who presented with a MC (relapse vs. remission).

In 11 of the 15 patients with MC, early detection of relapse was possible through both WT1 expression and chimerism analysis. In four patients, an increase in MC was detectable before relapse although no increase in WT1 could be found. However, five of the 12 patients with CC showed increasing WT1 levels in advance of relapse.

Fig. 4 Monitoring of minimal residual disease by WT1 for a patient with acute myeloid leukemia after bone marrow transplantation. A hematological relapse was prevented at a molecular level by withdrawal of cyclosporine. The patient presented with a complete donor chimerism at any time point

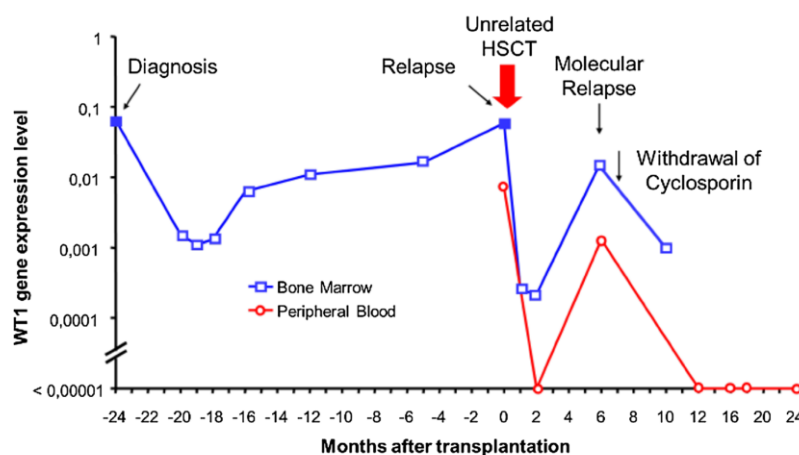
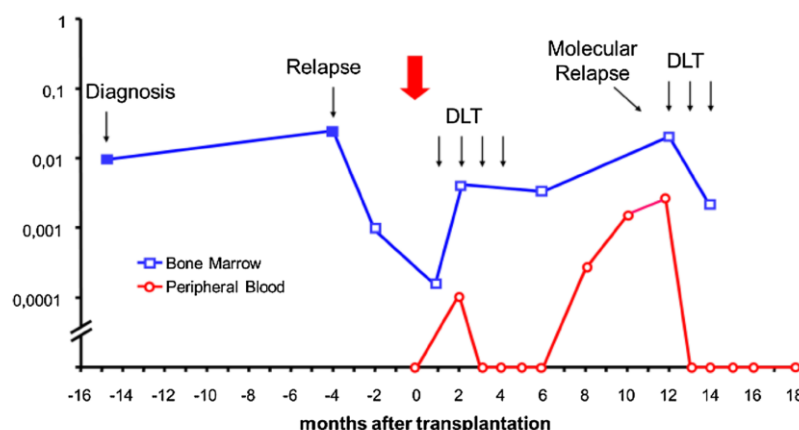


Fig. 5 Monitoring of minimal residual disease by WT1 for a patient with acute myeloid leukemia after peripheral blood stem cell transplantation. A molecular relapse was prevented from progressing to a hematological relapse by donor lymphocyte infusion. The patient presented with a complete donor chimerism at any time point



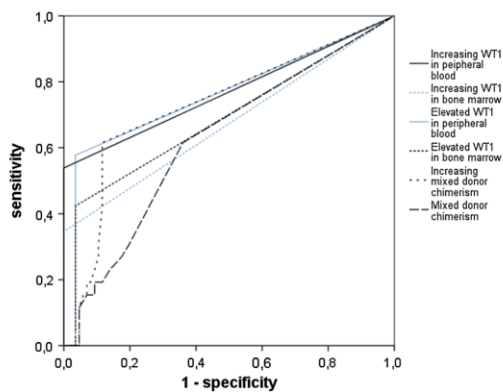


Fig. 6 ROC analyses of different parameters for the detection of minimal residual disease

Interestingly, the two patients suffering from a molecular relapse revealed no mixed chimerism at any time point. Both showed a 100 % donor chimerism on the respective days on which elevated WT1 levels were found in PB and BM.

Concerning the period of time before relapse when increasing levels were first noticed, we found contradictory results for the 11 patients that showed both increasing WT1 levels and MC. Four times WT1 expression was able to detect an impending relapse earlier than chimerism analysis. Four other patients showed an increase in WT1 and chimerism on the same day. In contrast, one child showed a MC 136 days before relapse, when elevated WT1 levels could only be seen 20 days earlier. Another patient presented with MC 177 days before relapse, whereas a WT1 increase was only verified 46 days in advance. A third one had a detectable MC 74 days before relapse when WT1 increased only 15 days in advance. Based on the long interval, the MC seemed to qualify more as an adverse prognostic marker than a direct MRD marker in the beginning.

A combination of both techniques would have been able to detect 74 % of relapses (20/27). The best prediction on the occurrence of relapse however could be achieved when elevated WT1 levels at any point, increasing WT1 levels and an increase in MC, were taken into account. Thus, a sensitivity of 81.5 % and a specificity of 83.7 % could be achieved. As a single marker, increasing WT1 levels proved to be significantly more specific than chimerism analysis and elevated WT1 levels ($p < 0.05$). Differences in sensitivity were not significant. Figure 6 shows ROC analyses of the peak values of each parameter. Elevated WT1 levels in PB reached a greater area under the curve (AUC) than elevated WT1 levels in BM or MC.

Discussion

The importance of monitoring MRD after HSCT is widely accepted. Still, opinions continue to differ about the most appropriate method (Bader et al. 2008; Justyna Jólkowska and Dawidowska 2007). This study investigated the impact of WT1 expression after transplantation in children, adolescents and young adults with malignant hematological diseases and compared it to the analysis of donor chimerism. We were thereby able to demonstrate that WT1 is suitable for the detection of an impending relapse, like it has been proposed for adult patients by several authors before (Candoni et al. 2011; Ogawa et al. 2003; Zhao et al. 2012).

For our analyses, we employed BM and PB likewise, as an elevated WT1 expression can be distinguished in both. However, the use of PB might be beneficial due to an improved sensitivity. Thus, an increase in WT1 was mostly detected in PB. This can be easily explained by a better feasibility of blood draw compared to BM puncture in long-term follow-up. As a result, MRD detection out of PB might be more practical. This has previously been discussed for adult patients, too (Kwon et al. 2012; Ogawa et al. 2003). By this means, children could also be spared the necessity of perpetual BM punctures in persistent remission.

To additionally improve sensitivity, continuous monitoring in short intervals should be recommended. Unfortunately, in some cases, we were not able to detect an increase in WT1, because the interval from the last control sample to relapse was too long. This especially happened when relapse occurred late after transplantation. As WT1 levels can increase either rapidly or gradually, any elevated WT1 expression should be taken seriously and tested again in a short interval. Hence, it is of great importance to pay attention not only to single elevated WT1 levels, but also to the dynamics of WT1 expression. Only a combination of both can lead to a decision about immunotherapeutic interventions like discontinuation of immunosuppression or donor lymphocyte infusion (Eva Rettinger et al. 2011). It further needs to be mentioned that in case more specific markers like fusion genes are available, those should be used instead. However, WT1 has proven to be especially useful for diseases missing such markers, namely most children, adolescents and young adults with AML, MDS and JMML (Bader et al. 2004b; Christopheit et al. 2014; Pozzi et al. 2013).

Until now, a comparison of WT1 expression and chimerism analysis has only been described for adults (Candoni et al. 2011; Kwon et al. 2012; Lange et al. 2011). We were able to demonstrate that WT1 surpasses chimerism analysis regarding its specificity. Additionally, the two molecular relapses were only detectable by WT1 expression. Though in clinical routine, a combination of both methods might

raise their sensitivity and informative value. Furthermore, MC analysis gives important information about an impending graft failure which WT1 analysis cannot provide. Therefore, it represents an essential method for post-transplant follow-up. On the other hand, only an independent leukemic marker like WT1 can evaluate if a MC is due to an impending relapse or a graft failure. Regrettably, DNA samples were not always available, and further studies are necessary to evaluate both markers.

Nevertheless, especially in children with AML, JMML and MDS, analyses of WT1 expression and chimerism can help identify patients who are eligible for immunotherapy. Since immunotherapy is most effective when performed at relapse at a molecular level (Pulsipher et al. 2009), it is crucial to detect patients at risk as early as possible. Interestingly, a recent approach in immunotherapy targets WT1 through vaccination or donor T cell specificity (Hashii et al. 2010; Weber et al. 2009). Here, detection of WT1 overexpression might be useful for all hematological malignancies. In conclusion, WT1 is a useful tool for MRD monitoring after transplantation in children, adolescents and young adults and should be combined with an analysis of chimerism when more specific markers are missing.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical standards All procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional and national) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2008. Informed consent was obtained from all patients for being included in the study.

References

- Bader P, Holle W, Klingebiel T, Handgretinger R, Niethammer D, Beck J (1996) Quantitative assessment of mixed hematopoietic chimerism by polymerase chain reaction after allogeneic BMT. *Anticancer Res* 16:1759–1763
- Bader P et al (2004a) Increasing mixed chimerism is an important prognostic factor for unfavorable outcome in children with acute lymphoblastic leukemia after allogeneic stem-cell transplantation: possible role for pre-emptive immunotherapy? *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 22:1696–1705. doi:10.1200/JCO.2004.05.198
- Bader P et al (2004b) WT1 gene expression: useful marker for minimal residual disease in childhood myelodysplastic syndromes and juvenile myelo-monocytic leukemia? *Eur J Haematol* 73:25–28. doi:10.1111/j.1600-0609.2004.00260.x
- Bader P, Willasch A, Klingebiel T (2008) Monitoring of post-transplant remission of childhood malignancies: is there a standard? *Bone Marrow Transpl* 42(Suppl 2):S31–S34. doi:10.1038/bmt.2008.280
- Boublikova L et al (2006) Wilms' tumor gene 1 (WT1) expression in childhood acute lymphoblastic leukemia: a wide range of WT1 expression levels, its impact on prognosis and minimal residual disease monitoring. *Leukemia* 20:254–263. doi:10.1038/sj.leu.2404047
- Candoni A, Toffoletti E, Gallina R, Simeone E, Chiozzotto M, Volpetti S, Fanin R (2011) Monitoring of minimal residual disease by quantitative WT1 gene expression following reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation in acute myeloid leukemia. *Clin Transpl* 25:308–316. doi:10.1111/j.1399-0012.2010.01251.x
- Christopeit M, Kroger N, Haferlach T, Bacher U (2014) Relapse assessment following allogeneic SCT in patients with MDS and AML. *Ann Hematol*. doi:10.1007/s00277-014-2046-8
- Collins RH Jr et al (1997) Donor leukocyte infusions in 140 patients with relapsed malignancy after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 15:433–444
- Elmaagacli AH, Beelen DW, Trensche R, Schaefer UW (2000) The detection of wt-1 transcripts is not associated with an increased leukemic relapse rate in patients with acute leukemia after allogeneic bone marrow or peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transpl* 25:91–96. doi:10.1038/sj.bmt.1702095
- Eva Rettinger AMW, Kreyenberg H, Borkhardt A, Holter W, Kremens B, Strahm B, Woessmann W, Mauz-Koerholz C, Gruhn B, Burdach S, Albert MH, Schlegel P-G, Klingebiel T, Bader P (2011) Preemptive immunotherapy in childhood acute myeloid leukemia for patients. *Blood* 118:5681–5688. doi:10.1182/blood-2011-04-348805
- Hashii Y, Sato E, Ohta H, Oka Y, Sugiyama H, Ozono K (2010) WT1 peptide immunotherapy for cancer in children and young adults. *Pediatr Blood Cancer* 55:352–355. doi:10.1002/pbc.22522
- Inoue K et al (1996) Long-term follow-up of minimal residual disease in leukemia patients by monitoring WT1 (Wilms tumor gene) expression levels. *Blood* 88:2267–2278
- Jacobsohn DA et al (2009) High WT1 gene expression before hematopoietic stem cell transplant in children with acute myeloid leukaemia predicts poor event-free survival. *Br J Haematol* 146:669–674. doi:10.1111/j.1365-2141.2009.07770.x
- Justyna Jolkowska KD, Dawidowska Malgorzata (2007) Methods of minimal residual disease (MRD) detection in childhood haematological malignancies. *J Appl Genet* 48:77–83
- Kletzel M, Olzewski M, Huang W, Chou PM (2002) Utility of WT1 as a reliable tool for the detection of minimal residual disease in children with leukemia. *Pediatr Dev Pathol Off J Soc Pediatr Pathol Paediatr Pathol Soc* 5:269–275. doi:10.1007/s10024001-0208-x
- Kwon M et al (2012) Evaluation of minimal residual disease by real-time quantitative PCR of Wilms' tumor 1 expression in patients with acute myelogenous leukemia after allogeneic stem cell transplantation: correlation with flow cytometry and chimerism. *Biol Blood Marrow Transpl J Am Soc Blood Marrow Transpl* 18:1235–1242. doi:10.1016/j.bbmt.2012.01.012
- Lange T et al (2011) Monitoring of WT1 expression in PB and CD34(+) donor chimerism of BM predicts early relapse in AML and MDS patients after hematopoietic cell transplantation with reduced-intensity conditioning. *Leukemia* 25:498–505. doi:10.1038/leu.2010.283
- Ogawa H et al (2003) The usefulness of monitoring WT1 gene transcripts for the prediction and management of relapse following allogeneic stem cell transplantation in acute type leukemia. *Blood* 101:1698–1704. doi:10.1182/blood-2002-06-1831
- Pozzi S et al (2013) Leukaemia relapse after allogeneic transplants for acute myeloid leukaemia: predictive role of WT1 expression. *Br J Haematol* 160:503–509. doi:10.1111/bjh.12181
- Pulsipher MA, Bader P, Klingebiel T, Cooper LJ (2009) Allogeneic transplantation for pediatric acute lymphoblastic leukemia: the emerging role of peritransplantation minimal residual disease/chimerism monitoring and novel chemotherapeutic, molecular, and immune approaches aimed at preventing relapse. *Biol Blood Marrow Transpl J Am Soc Blood Marrow Transpl* 15:62–71. doi:10.1016/j.bbmt.2008.11.009

- Roux E, Helg C, Chapius B, Jeannet M, Roosnek E (1994) Mixed chimerism after bone marrow transplantation and the risk of relapse. *Blood* 84:4385–4386
- Weber G et al (2009) WT1 peptide-specific T cells generated from peripheral blood of healthy donors: possible implications for adoptive immunotherapy after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia* 23:1634–1642. doi:[10.1038/leu.2009.70](https://doi.org/10.1038/leu.2009.70)
- Willasch AM et al (2009) Standardization of WT1 mRNA quantitation for minimal residual disease monitoring in childhood AML and implications of WT1 gene mutations: a European multicenter study. *Leukemia* 23:1472–1479. doi:[10.1038/leu.2009.51](https://doi.org/10.1038/leu.2009.51)
- Woehlecke C, Wittig S, Arndt C, Gruhn B (2014) Prognostic impact of WT1 expression prior to hematopoietic stem cell transplantation in children with malignant hematological diseases. *J Cancer Res Clin Oncol*. doi:[10.1007/s00432-014-1832-y](https://doi.org/10.1007/s00432-014-1832-y)
- Zhao XS et al (2012) Wilms' tumor gene 1 expression: an independent acute leukemia prognostic indicator following allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transpl* 47:499–507. doi:[10.1038/bmt.2011.121](https://doi.org/10.1038/bmt.2011.121)

5. Diskussion

5.1. WT1-Expression vor HSZT

Eine HSZT stellt eine sehr intensive und komplikationsreiche Therapieform mit kurativer Intention dar. Eine besonders schlechte Prognose hat dabei ein Rezidiv nach Transplantation, welches noch immer die häufigste Todesursache nach HSZT darstellt (van den Brink et al. 2010). Die 2-Jahres Überlebensraten liegen nach einer zweiten Transplantation bei 35 %, ohne diese sind sie deutlich geringer (Bajwa et al. 2013). Deshalb ist es von essentieller Bedeutung, Patienten mit einem besonders hohen Rezidivrisiko herauszufiltern, um diese besonders engmaschig kontrollieren oder frühzeitig immuntherapeutisch behandeln zu können (Leung et al. 2012).

Zu diesem Zweck wurde die prognostische Bedeutung der Höhe der WT1-Expression vor HSZT untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass diese, als Marker für die minimale Resterkrankung, einen negativen Einfluss auf das Überleben der Patienten nach HSZT hat. Dies stimmt überein mit den Ergebnissen von Jacobsohn et al. und Valkova et al., die diesen Zusammenhang schon für Kinder (Jacobsohn et al. 2009) bzw. für Erwachsene mit AML beschrieben haben (Valkova et al. 2013). Ähnliches berichteten Bader et al. für die durch Ig- und TZR-Genrearrangement quantifizierte MRD-Last bei Kindern mit ALL (Bader et al. 2002). Trotzdem stellt ein MRD-Nachweis keine Kontraindikation für die Durchführung einer Transplantation dar und schließt eine Heilung nicht aus. Denn eine weitere Reduktion der MRD-Last ist immer auch mit einer zusätzlichen Toxizität verbunden (Leung et al. 2012). Dennoch wird diese von manchen Autoren empfohlen (Balduzzi et al. 2014), wenn die nachgewiesene MRD-Last sehr hoch ist. Da wir jedoch eine retrospektive Kohortenstudie durchführten, lassen sich keine Aussagen über Vor- und Nachteile solcher Interventionen treffen.

Mithilfe multivariater Analysen konnte außerdem nachgewiesen werden, dass trotz der Einflüsse anderer Faktoren, wie dem Auftreten einer akuten GVHD (Grad 2-4) oder dem Krankheitsrisiko (Arndt et al. 2014), in der univariaten Analyse nur die WT1-Analyse signifikant mit dem Ereignis-freien Überleben korrelierte.

Des Weiteren stellte sich heraus, dass eine Überwachung der WT1-Expression besonders für bestimmte Patientenkollektive geeignet ist. So konnten wir in Einklang mit den Ergebnissen von Boublikova et al. (Boublikova et al. 2006) keine durchgängig signifikanten Zusammenhänge von WT1-Expression und Prognose bei Kindern mit ALL finden. Glücklicherweise haben sich sowohl bei der ALL mit dem Ig- und TZR-Genrearrangement, als auch bei der im Kindesalter sehr seltenen CML mit dem BCR-ABL Fusionsgen andere MRD-Marker bewährt.

Im Gegensatz dazu konnte eine hochsignifikante Korrelation der WT1-Expression vor Transplantation mit der Rezidivwahrscheinlichkeit und dem Überleben von Patienten mit AML und MDS gezeigt werden. Da bei diesen Patienten nur vereinzelt spezifische Marker exprimiert werden, kann, wenn solche nicht nachweisbar sind, WT1 als universaler Marker verwendet werden (Ross et al. 2004). Quellenabhängig ist WT1 schon bei 80-90 % der AML-Patienten zum Diagnosezeitpunkt überexprimiert und die Expression im Rezidiv ist zumeist noch höher (Ostergaard et al. 2004, Weisser et al. 2005, Boublikova et al. 2006). Da je nach FAB-Subtyp unterschiedlich hohe Level zum Diagnosezeitpunkt beschrieben wurden (Trka et al. 2002, Rodrigues et al. 2007), empfiehlt es sich aber, die Expression vor Therapiebeginn zu bestimmen, um einen Wert für die Verlaufskontrolle zu haben.

Bei Patienten mit MDS und kommt der Überwachung der WT1-Expression eine essentielle Bedeutung zu, da vor allem vor Transplantation keine anderen Prognosemarker zur Verfügung stehen. Wie zuvor für erwachsene Patienten beschrieben (Tamaki et al. 1999, Cilloni et al. 2003), korrelierte hierbei die Höhe der WT1-Level mit dem Schweregrad des MDS. In unserem Patientenkollektiv kam es ausschließlich bei vor Transplantation MRD-positiven Kindern zu einem Rezidiv oder zu einem Wiederauftreten der Grunderkrankung. Speziell bei Kindern mit JMML, einer aggressiven Erkrankung mit hohen Rezidivraten (in diesem Kollektiv 43 %), könnte ein positiver MRD-Nachweis vor Transplantation daher zu einer Anpassung des Therapieregimes führen (Dvorak und Loh 2014). Aufgrund der Seltenheit dieser Krankheit und der dementsprechend geringen Fallzahl von sieben Patienten sind dafür jedoch weitere Studien notwendig.

5.2. WT1-Expression nach HSZT

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit bestand in der konsekutiven Messung und Auswertung der Höhe der WT1-Genexpression nach HSZT. Hierbei konnte gezeigt werden, dass alle Patienten, die ein Rezidiv nach Transplantation erlitten, auch erhöhte WT1-Werte im Rezidiv aufwiesen.

Dies stimmt überein mit den Beobachtungen anderer Autoren, die eine höhere Expression im Rezidiv beschrieben, selbst wenn, wie bei der ALL zum Diagnosezeitpunkt, nicht alle Patienten eine Überexpression zeigten (Niegemann et al. 1999). Obwohl die Ursache dessen wie auch die genauen Wirkungen von WT1 auf Zellwachstum und Tumorgenese bis heute nicht abschließend geklärt werden konnten, so ist es doch ein Indiz dafür, dass WT1 besonders dafür geeignet ist, Rezidive nach Transplantation zu erkennen (Scharnhorst et al. 2001).

Trotzdem bestand über die Nützlichkeit von WT1 bei kindlichen Leukämien in der Literatur lange Zeit Uneinigkeit (Elmaagacli et al. 2000, Kletzel et al. 2002, Trka et al. 2002, Rodrigues et al. 2007). Jüngere Untersuchungen an erwachsenen Patienten mit AML (Candoni et al. 2011, Zhao et al. 2012, Pozzi et al. 2013) sowie Patienten mit MDS (Bader et al. 2004a, Cilloni und Saglio 2004) zeigten jedoch durchgängig einen Nutzen.

Es stellte sich heraus, dass ein Anstieg von WT1 nach HSZT sehr spezifisch für ein folgendes morphologisches Rezidiv ist. Wohingegen jegliche erhöhte WT1-Werte nach Rekonstitution zwar weniger spezifisch, dafür aber sensitiver für das Auftreten eines Rezidivs waren. Daher ist es generell empfehlenswert, WT1 im Verlauf zu betrachten und auf über den Grenzwert erhöhte Expressionslevel mit, beispielsweise wöchentlichen, Kontrollen zu reagieren. Ein solches Verfahren muss jedoch im klinischen Alltag evaluiert werden.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass mit dem Einsatz unterschiedlicher Cut-Offs ein MRD-Monitoring nach Transplantation, sowohl im peripheren Blut, als auch im Knochenmark, möglich ist. Daher ist es denkbar, die WT1-Expression für die Langzeitnachsorge im peripheren Blut zu bestimmen (Malagola et al. 2014). Speziell Kindern können auf diese Weise unnötige Sedierungen für Knochenmarkpunktion erspart bleiben.

Durch die WT1-Analyse waren wir in der Lage, Rezidive bei fast allen malignen hämatologischen Erkrankungen vorherzusagen. Lediglich das einzige Rezidiv eines Patienten mit CML blieb unentdeckt. Trotz unzureichender Aussagekraft wegen zu geringer Fallzahlen, lässt sich WT1 für die CML nicht empfehlen, da bei dieser Erkrankung die MRD-Analyse mittels BCR-ABL der Goldstandard ist.

Im Gegensatz dazu ließen sich alle Rezidive von Patienten mit MDS und JMML anhand eines WT1-Anstiegs frühzeitig erkennen.

Bei den Kindern mit akuten Leukämien konnte jeweils nur ein Teil der Rezidive vorhergesagt werden. Dies lag zum Teil in zu langen Kontrollintervallen begründet. Trotzdem wurde WT1 speziell bei der Fusionstranskript-negativen AML von verschiedenen Studien als geeigneter MRD-Marker eingeschätzt (Christopeit et al. 2014)

Bei der ALL hingegen gehen die Meinungen über die generelle Bedeutung des MRD-Monitorings nach HSZT sowie den Einfluss von WT1 im Speziellen auseinander (Imashuku et al. 2003, van der Velden et al. 2003, Justyna Jółkowska 2007, Bader et al. 2008, Pulsipher et al. 2009, Balduzzi et al. 2014). Während vor Transplantation das Ig- und TZR-Genrearrangement als Goldstandard gilt, so erschwerte zu Anfang die teilweise stattfindende klonale Evolution nach Transplantation die Primerbindung. In neueren Studien konnte jedoch eine Überlegenheit dieser Methode gegenüber WT1 festgestellt werden (Sawada et al. 2009). Da WT1 auch in dieser Arbeit nicht bei allen Patienten zur Rezidiverkennung geeignet zu sein schien, bleibt dessen Nützlichkeit in diesem Patientenkollektiv daher fraglich.

In Zukunft versprechen neuere Ansätze wie die Analyse der Hypermethylierung des alternativen AWT1 Promoters eine eventuell noch spezifischere Prognose bei der AML (Guillaumet-Adkins et al. 2014). Neuere Untersuchungen beschrieben außerdem einen Einfluss eines bestimmten Single Nucleotide Polymorphism (SNP) im WT1-Gen auf die Prognose von AML-Patienten mit WT1-Überexpression (Damm et al. 2010, Ho et al. 2014).

Wie bei zwei unserer Patienten mit AML beschrieben, kann durch rechtzeitige immunologische Interventionen wie dem Absetzen der Immunsuppression oder der DLI ein morphologisches Rezidiv verhindert werden (Collins et al. 1997).

Nachdem herausgefunden wurde, dass WT1-spezifische zytotoxische T-Zellen einen GVL-Effekt hervorrufen (Rezvani et al. 2007), konzentrieren sich neue Therapieansätze auch auf eine WT1 basierte Immuntherapie (Weber et al. 2009, Hashii et al. 2010, Sugiyama 2010, Rein und Chao 2014).

5.2.1. Analyse des Spenderchimärismus

Ein weiteres Anliegen dieser Arbeit war es, WT1, in Bezug auf die Vorhersagewahrscheinlichkeit eines Rezidivs, mit dem Auftreten eines MC zu vergleichen. Wie zuvor beschrieben, weist die Chimärismusanalyse lediglich residuelle autologe Zellen unabhängig von ihrer Dignität nach und kann daher nur als indirekte MRD-Technik gesehen werden.

Den Erwartungen entsprechend war die Spezifität eines MC-Anstiegs daher auch signifikant niedriger als die des WT1-Anstiegs. Hierbei fielen vor allem die unterschiedlich langen Intervalle zwischen erstmaligem MRD-Nachweis und dem hämatologischem Rezidiv auf. Während steigende WT1-Werte zwar unterschiedlich schnell jedoch schlussendlich immer zu einem Rezidiv führten, so kann ein MC auch im Rahmen einer Toleranz längerfristig bestehen. Dies zeigte sich bei einigen Patienten auch durch einen MC, der dem Anstieg der WT1-Expression deutlich vorausging. Andererseits ist die Sensitivität der Expressionsanalyse für die Entdeckung residueller maligner Zellen (ca. 10^{-4}) methodisch bedingt höher als die der Chimärismusanalyse (ca. 10^{-2}) (K Inoue und Nasu 1994, Liesveld und Rothberg 2008). Dadurch lässt sich erklären, warum bei Patienten mit zuvor CC, WT1 teilweise drohende Rezidive früher erkennen ließ. Auffällig war auch, dass bei beiden Patienten, die lediglich ein molekulares Rezidiv erlitten und mithilfe immuntherapeutischer Interventionen eine erneute molekulare Remission erreichten, ausschließlich ein WT1-Anstieg, bei zu jedem Zeitpunkt 100 prozentigem Spenderchimärismus, zu erkennen war.

Da aber die klinischen Unterschiede in der Sensitivität beider MRD-Marker nicht signifikant waren, lässt sich schlussfolgern, dass sich WT1- und Chimärismusanalyse in Ihrer Vorhersagekraft eher ergänzen. Ähnliches berichteten auch Studien an erwachsenen Patienten mit AML und MDS (Lange

et al. 2011, Kwon et al. 2012). Ein umfassender Vergleich beider Marker bei pädiatrischen Patienten stand jedoch, trotz zahlreicher Literatur über den Nutzen der Chimärismusanalyse, noch aus (Rettinger et al. 2011, Inagaki et al. 2013, Willasch et al. 2014).

Vor allem bei Erwachsenen wird auch eine höhere Sensitivität bei der Untersuchung von CD34+ selektionierten Zellen diskutiert. Dies ist allerdings nicht nur deutlich aufwendiger sondern unter Umständen bei jüngeren Kindern auch durch zu geringe Zellzahlen limitiert (Bornhauser et al. 2009, Lange et al. 2011). Trotzdem kann durch die Verwendung unselektionierter mononukleärer Zellen ein sogenannter Split-Chimärismus, der sich nur in bestimmten Zelllinien als gemischt darstellt, übersehen werden (Bader et al. 2005).

Hervorzuheben ist außerdem noch einmal, dass sich beide Marker, trotz ihrer gemeinsamen Eigenschaft Rezidive frühzeitig zu erkennen, grundlegend unterscheiden.

Während WT1 zwar in geringen Mengen auch von normalen hämatopoetischen Stammzellen exprimiert wird und die Expression im regenerierenden Knochenmark daher schwanken kann (Alonso-Dominguez et al. 2012), so konnten wir doch zeigen, dass eine Überexpression relativ spezifisch maligne hämatologische Zellen nachweist. Dementsprechend ist es anhand der WT1-Expression aber auch nicht möglich ein Transplantatversagen zu diagnostizieren, solange normale hämatopoetische Zellen vorherrschen. Aufgrund erwähnter immunologischer Zusammenhänge besteht in diesem Fall aber trotzdem ein erhöhtes Rezidivrisiko.

Die Chimärismusanalyse hingegen ist einerseits sehr sensitiv für ein Transplantatversagen, andererseits ist sie nicht in der Lage, die Dignität autologer Signale zu differenzieren. Einen weiteren Spezialfall stellt die Spenderzelleukämie dar. Diese seltene Form eines "Rezidivs", kann zwar methodisch bedingt nicht frühzeitig durch die Chimärismusanalyse erkannt werden, letztlich kann sie aber nur über den CC überhaupt diagnostiziert werden (Wiseman 2011).

Außerdem wurde von Kwon et al. eine Überlegenheit der WT1-Expression im peripheren Blut gegenüber der Chimärismusanalyse bei der Erkennung von

extramedullären Rezidiven beschrieben (Kwon et al. 2012). Wegen fehlender extramedullärer Rezidive in unserem Patientenkollektiv, ließ sich diese Feststellung an dieser Stelle nicht überprüfen.

Aktuell erscheint jedoch eine Kombination aus WT1- (bzw. Fusionsgen-) Expression und Chimärismusanalyse, als am besten für das MRD-Monitoring bei Kindern mit AML, MDS und JMML geeignet.

Außerdem existieren eine Reihe weiterer Ansätze zum MRD-Monitoring bei Patienten mit AML. Beispiele hierfür sind Mutationen im Nucleophosmin-Gen (NPM1), die bei ca. 60 % der Patienten mit AML und normalem Karyotyp gefunden wurden (Kristensen et al. 2011), die „brain and acute leukemia, cytoplasmic“-Gen (BAALC) -Expression (Yoon et al. 2013) oder die Expression des „preferentially expressed antigen of melanoma“-Gens (PRAME) (Steinbach et al. 2002). Auch die zuvor erwähnte Durchflusszytometrie wurde in anderen Studien mit der WT1-Expression verglichen und teilweise als Ergänzung empfohlen. Diese alternativen Marker zu untersuchen, war jedoch nicht Teil dieser Arbeit.

5.3. Methodik und Limitationen

Die Entnahme zusätzlichen Patientenmaterials für wissenschaftliche Zwecke wurde nur nach Einverständnis und im Rahmen von Routineuntersuchungen durchgeführt. Dadurch waren die Proben jedoch manchmal sehr zellarm und es konnte nicht ausreichend RNA isoliert werden oder es waren von bestimmten Zeitpunkten keine zusätzlichen kryokonservierten Tubes z. B. zur DNA-Isolierung für die Chimärismusanalyse verfügbar. Daher sollte in einer zukünftigen prospektiv angelegten Studie sichergestellt werden, dass in angemessen kurzen Zeitintervallen eine ausreichende Menge Patientenmaterial entnommen wird.

Um die Reinheit unserer Proben zu gewährleisten wurden, neben der Einhaltung von Hygienestandards wie dem Tragen und regelmäßigen Wechseln von Einmalhandschuhen, alle Arbeitsschritte in getrennten Räumen und mit unterschiedlichen Pipetten durchgeführt. Eine DNA-Kontamination während der Isolation der

RNA wurde durch den Zusatz von Desoxyribonuklease (Qiagen, Hilden, Deutschland) verhindert. Zur weiteren Qualitätskontrolle wurde die Reinheit der RNA mithilfe des Quotienten der spektrometrischen Absorption bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Außerdem wurde bei der PCR-Analyse neben einer Doppelbestimmung auch immer eine Negativkontrolle mitgeführt um eine Kontamination des Ansatzes auszuschließen.

Zur Bestimmung der WT1-Genexpression verwendeten wir eine Real-Time quantitative RT-PCR und das ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA). Die Methode entsprach dabei weitestgehend der von Ogawa et al. und Tamaki et. al. beschriebenen (Ogawa et al. 2003, Tamaki et al. 2003). Allerdings benutzten wir zur Normalisierung unserer WT1-Werte das Haushaltsgen β 2-Mikroglobulin, da es, wie von Banda et. al. beschrieben, eine bessere Stabilität gegenüber externen Einflüssen bietet als β -Aktin (Banda et al. 2008). Neuere Methoden benutzen Plasmide anstelle der von uns verwendeten Leukämiezelllinie K562 (Cilloni et al. 2009, Willasch et al. 2009). Trotz der in letzter Zeit standardisierten Verwendung dieser Methode, war eine Umstellung in unserer langfristig durchgeführten Single-Center-Studie nicht möglich, da die Werte nicht ausreichend korrelierten. Nichtsdestoweniger erhielten wir mit unserer wissenschaftlich anerkannten Methode aussagekräftige Werte. Aufgrund einer im peripheren Blut geringeren Sensitivität der K562-basierten Methode im Vergleich zu der Verwendung von Plasmiden, konnten wir im Gegensatz zu Cilloni et al. bei Patienten in Remission oft keine Expression nachweisen. Da diese jedoch weit unter dem Grenzwert lägen, werden falsch positive Werte, die keinerlei Konsequenzen hätten, vermieden. Für zukünftige Untersuchung ist es trotzdem zu empfehlen, die in unserer Einrichtung ebenfalls etablierten Plasmide zu verwenden, um eine internationale Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

Für die Bestimmung des Chimärismus wurde eine in pädiatrischen Studien etablierte semiquantitative singleplex PCR von Short Tandem Repeats durchgeführt (Beck et al. 2006). Die Sensitivität dieses Verfahrens liegt methodenbedingt bei ca. 1 %, es wird also eine autologe Zelle in 100 mononukleären Zellen entdeckt. Es wurde jedoch beschrieben, dass mit einer höheren Sensitivität zwar

meist noch lange nach Transplantation residuelle Empfängerzellen gefunden werden, diese jedoch nicht mit einem erhöhten Rezidivrisiko verbunden sind (Petit et al. 1994, Liesveld und Rothberg 2008).

Auf die Chimärismusanalyse aus der für die Rezidivvorhersage spezifischeren CD34+ Subpopulation wurde verzichtet, da hierfür, wie zuvor beschrieben, deutlich größere Blut- und Knochenmarkproben nötig sind und diese Methode deshalb für Kinder ungeeignet ist (Bader et al. 2005).

5.4. Ausblick

Abschließend soll noch ein Überblick über die möglichen Implikationen dieser Arbeit und zukünftige Ansätze gegeben werden.

Generell erhofft man sich durch die Messung der MRD, Rezidive auf molekularer Ebene zu erkennen, um so frühzeitig immuntherapeutisch eingreifen zu können. Dies erwies sich in Studien nur bei einer geringen Anzahl maligner Zellen als sinnvoll (Pulsipher et al. 2009). Das Absetzen der Immunsuppression oder die DLI soll hierbei den GVL-Effekt unterstützen und zu einer dauerhaften Remission führen. Andererseits kann es auch zu einer verstärkten GVHD kommen, die im schlimmsten Fall tödlich enden kann (Roddie und Peggs 2011). Daher ist es wichtig, die Patienten die davon profitieren können, sorgfältig auszuwählen. Das Gleiche gilt auch für neuere Therapieansätze, die darauf abzielen, einen möglichst starken GVL-Effekt bei soweit wie möglich reduzierter GVHD zu erzielen (Rezvani 2011). Auch wenn vielleicht in Zukunft im Rahmen einer personalisierten Medizin immer häufiger für den malignen Zellklon des Individuums spezifische Marker erforscht und verwendet werden, so stellen WT1 und Chimärismus doch ubiquitär einsetzbare MRD-Marker dar, die für viele Patienten momentan die beste Möglichkeit der Überwachung residueller maligner Zellen sind (Christopeit et al. 2014). Generell stellen neben der Verwendung von Fusionsgenen und Rearrangements auch die Chimärismusanalyse in angereicherten Zellpopulationen Optionen dar, die Sensitivität der MRD-Überwachung zu erhöhen (Boeckx et al. 2002, Bornhauser et al. 2009).

Um die Effektivität der Rezidivvorhersage der in dieser Arbeit beschriebenen

Methode noch besser bewerten zu können, wäre es denkbar, ein prospektive Interventionsstudie in einem geeigneten Patientenkollektiv durchzuführen.

Hierbei sollten ausschließlich Patienten ohne spezifischere Alternativmarker eingeschlossen werden. Parallel zu der zumeist routinemäßig durchgeführten Chimärismusanalyse müssen dann in engen Abständen WT1-Kontrollen nach Transplantation durchgeführt werden, da Anstiege auch nach sehr kurzen Intervallen zu einem Rezidiv führen können.

Diese Arbeit konnte zeigen, dass dafür Proben aus peripherem Blut mindestens genauso gut geeignet sind wie Proben aus Knochenmark. In Anlehnung an das von Bader et al. beschriebene Interventionsschema könnten steigende WT1-Werte dann ebenfalls zu einer Immuntherapie führen (Bader et al. 2005). Ergänzend dazu sollte jedoch auch der WT1-Wert vor HSZT in die Entscheidung einbezogen werden, da dieser signifikant mit dem Rezidiv-freien- und Gesamtüberleben korreliert. Daher ist vor allem bei vor Transplantation MRD-positiven Patienten ein frühzeitiges Absetzen der Immunsuppression oder eine DLI in Erwägung zu ziehen, sobald steigende WT1-Level gemessen werden.

Nur durch solch eine prospektive Untersuchung lässt sich abschließend klären, ob eine Analyse der WT1-Genexpression zusätzlich zu der Bestimmung des Spenderchimärismus das Langzeitüberleben von Kindern mit malignen hämatologischen Erkrankungen nach HSZT verbessern kann.

6. Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Promotionsarbeit wurde ein Kollektiv, bestehend aus 148 Patienten mit allen im Kindesalter auftretenden malignen hämatologischen Erkrankungen, retrospektiv untersucht. Die Arbeit beschäftigte sich mit dem peritransplantären Einfluss der WT1-Genexpression auf das Auftreten von Rezidiven sowie das Überleben von Kindern mit ALL, AML, CML, JMML und MDS. Abschließend können folgende Schlüsse gezogen werden:

Die Höhe der WT1-Expression in peripherem Blut und Knochenmark vor HSZT korreliert bei Kindern mit AML und MDS signifikant mit der Rezidivhäufigkeit und dem Gesamtüberleben. Sie eignet sich daher als prognostischer Marker.

Nach HSZT sollten WT1- und Chimärismusbestimmung zum MRD-Monitoring kombiniert angewandt werden, da sich auf die Weise die Sensitivität erhöhen lässt.

Gleichzeitig sollte die MRD-Bestimmung langfristig in regelmäßigen Intervallen durchgeführt werden.

Insofern keine spezifischen Fusionsgene oder Rearrangements vorhanden sind, kann WT1 bei Kindern mit AML als MRD-Marker verwendet werden.

Zur MRD-Überwachung nach HSZT bei Kindern mit MDS und JMML sollte WT1 momentan als Standard angesehen werden.

Bei Kindern mit ALL ist vermutlich die Untersuchung des Ig- und TZR-Genrearrangement der WT1-Expression überlegen, da WT1 keine ausreichende Sensitivität zeigte.

Für Patienten mit CML ist das MRD-Monitoring anhand des spezifischeren Fusionsgens BCR-ABL zu bevorzugen.

Prospektive Studien mit ähnlich großen Fallzahlen sind erforderlich, um die Nützlichkeit von WT1 und Chimärismus für die Entscheidungsfindung über immuntherapeutische Interventionen weiter evaluieren zu können.

7. Literatur- und Quellenverzeichnis

- Alonso-Dominguez JM, Tenorio M, Velasco D, Abalo L, Lozano S, Villarrubia J, Lopez-Jimenez J, Grande S, Ayala R. 2012. Correlation of WT1 expression with the burden of total and residual leukemic blasts in bone marrow samples of acute myeloid leukemia patients. *Cancer Genet*, 205 (4):190-191.
- Arndt C, Beck JF, Gruhn B. 2014. A pediatric prognostic score for patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Eur J Haematol*.
- Bader P, Willasch A, Klingebiel T. 2008. Monitoring of post-transplant remission of childhood malignancies: is there a standard? *Bone Marrow Transplant*, 42 Suppl 2:S31-34.
- Bader P, Niethammer D, Willasch A, Kreyenberg H, Klingebiel T. 2005. How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation? *Bone Marrow Transplant*, 35 (2):107-119.
- Bader P, Niemeyer C, Weber G, Coliva T, Rossi V, Kreyenberg H, Gerecke A, Biondi A. 2004a. WT1 gene expression: useful marker for minimal residual disease in childhood myelodysplastic syndromes and juvenile myelomonocytic leukemia? *Eur J Haematol*, 73 (1):25-28.
- Bader P, Hancock J, Kreyenberg H, Goulden NJ, Niethammer D, Oakhill A, Steward CG, Handgretinger R, Beck JF, Klingebiel T. 2002. Minimal residual disease (MRD) status prior to allogeneic stem cell transplantation is a powerful predictor for post-transplant outcome in children with ALL. *Leukemia*, 16 (9):1668-1672.
- Bader P, Stoll K, Huber S, Geiselhart A, Handgretinger R, Niemeyer C, Einsele H, Schlegel PG, Niethammer D, Beck J, Klingebiel T. 2000. Characterization of lineage-specific chimaerism in patients with acute leukaemia and myelodysplastic syndrome after allogeneic stem cell transplantation before and after relapse. *Br J Haematol*, 108 (4):761-768.
- Bader P, Kreyenberg H, Hoelle W, Dueckers G, Kremens B, Dilloo D, Sykora KW, Niemeyer C, Reinhardt D, Vormoor J, Gruhn B, Lang P, Greil J,

- Handgretinger R, Niethammer D, Klingebiel T, Beck JF. 2004b. Increasing mixed chimerism defines a high-risk group of childhood acute myelogenous leukemia patients after allogeneic stem cell transplantation where pre-emptive immunotherapy may be effective. *Bone Marrow Transplant*, 33 (8):815-821.
- Bader P, Kreyenberg H, Hoelle W, Dueckers G, Handgretinger R, Lang P, Kremens B, Dilloo D, Sykora KW, Schrappe M, Niemeyer C, Von Stackelberg A, Gruhn B, Henze G, Greil J, Niethammer D, Dietz K, Beck JF, Klingebiel T. 2004c. Increasing mixed chimerism is an important prognostic factor for unfavorable outcome in children with acute lymphoblastic leukemia after allogeneic stem-cell transplantation: possible role for pre-emptive immunotherapy? *J Clin Oncol*, 22 (9):1696-1705.
- Bajwa R, Schechter T, Soni S, Gassas A, Doyle J, Sisler I, Godder K, Tatman D, Rumelhart S, Domm J, Miao Y, Frangoul H. 2013. Outcome of children who experience disease relapse following allogeneic hematopoietic SCT for hematologic malignancies. *Bone Marrow Transplant*, 48 (5):661-665.
- Balduzzi A, Di Maio L, Silvestri D, Songia S, Bonanomi S, Rovelli A, Conter V, Biondi A, Cazzaniga G, Valsecchi MG. 2014. Minimal residual disease before and after transplantation for childhood acute lymphoblastic leukaemia: is there any room for intervention? *Br J Haematol*, 164 (3):396-408.
- Banda M, Bommineni A, Thomas RA, Luckinbill LS, Tucker JD. 2008. Evaluation and validation of housekeeping genes in response to ionizing radiation and chemical exposure for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Mutat Res*, 649 (1-2):126-134.
- Beck O, Seidl C, Lehrnbecher T, Kreyenberg H, Schwabe D, Klingebiel T, Seifried E, Bader P, Koehl U. 2006. Quantification of chimerism within peripheral blood, bone marrow and purified leukocyte subsets: comparison of singleplex and multiplex PCR amplification of short tandem repeat (STR) loci. *Eur J Haematol*, 76 (3):237-244.
- Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, van't Veer MB. 1995. Proposals for the immunological classification of acute leukemias.

- European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*, 9 (10):1783-1786.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. 1976. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*, 33 (4):451-458.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. 1985a. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med*, 103 (4):620-625.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. 1985b. Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocyte lineage (M7). A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med*, 103 (3):460-462.
- Bishop M. 2009. Hematopoietic Stem Cell Transplantation Bethesda: Springer Science & Business Media
- Boeckx N, Willemse MJ, Szczepanski T, van der Velden VH, Langerak AW, Vandekerckhove P, van Dongen JJ. 2002. Fusion gene transcripts and Ig/TCR gene rearrangements are complementary but infrequent targets for PCR-based detection of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 16 (3):368-375.
- Bornhauser M, Oelschlaegel U, Platzbecker U, Bug G, Lutterbeck K, Kiehl MG, Schetelig J, Kiani A, Illmer T, Schaich M, Theuser C, Mohr B, Brendel C, Fauser AA, Klein S, Martin H, Ehninger G, Thiede C. 2009. Monitoring of donor chimerism in sorted CD34+ peripheral blood cells allows the sensitive detection of imminent relapse after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica*, 94 (11):1613-1617.
- Boublikova L, Kalinova M, Ryan J, Quinn F, O'Marcaigh A, Smith O, Browne P, Stary J, McCann SR, Trka J, Lawler M. 2006. Wilms' tumor gene 1 (WT1) expression in childhood acute lymphoblastic leukemia: a wide range of WT1 expression levels, its impact on prognosis and minimal residual disease monitoring. *Leukemia*, 20 (2):254-263.

- Buckner CD, Clift RA, Sanders JE, Stewart P, Bensinger WI, Doney KC, Sullivan KM, Witherspoon RP, Deeg HJ, Appelbaum FR, et al. 1984. Marrow harvesting from normal donors. *Blood*, 64 (3):630-634.
- Call KM, Glaser T, Ito CY, Buckler AJ, Pelletier J, Haber DA, Rose EA, Kral A, Yeger H, Lewis WH, et al. 1990. Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell*, 60 (3):509-520.
- Candoni A, Toffoletti E, Gallina R, Simeone E, Chiozzotto M, Volpetti S, Fanin R. 2011. Monitoring of minimal residual disease by quantitative WT1 gene expression following reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation in acute myeloid leukemia. *Clin Transplant*, 25 (2):308-316.
- Christopeit M, Kroger N, Haferlach T, Bacher U. 2014. Relapse assessment following allogeneic SCT in patients with MDS and AML. *Ann Hematol*.
- Cilloni D, Saglio G. 2004. WT1 as a universal marker for minimal residual disease detection and quantification in myeloid leukemias and in myelodysplastic syndrome. *Acta Haematol*, 112 (1-2):79-84.
- Cilloni D, Gottardi E, Messa F, Fava M, Scaravaglio P, Bertini M, Girotto M, Marinone C, Ferrero D, Gallamini A, Levis A, Saglio G, Piedmont Study Group on Myelodysplastic S. 2003. Significant correlation between the degree of WT1 expression and the International Prognostic Scoring System Score in patients with myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol*, 21 (10):1988-1995.
- Cilloni D, Renneville A, Hermitte F, Hills RK, Daly S, Jovanovic JV, Gottardi E, Fava M, Schnittger S, Weiss T, Izzo B, Nomdedeu J, van der Heijden A, van der Reijden BA, Jansen JH, van der Velden VH, Ommen H, Preudhomme C, Saglio G, Grimwade D. 2009. Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized WT1 assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: a European LeukemiaNet study. *J Clin Oncol*, 27 (31):5195-5201.
- Collins RH, Jr., Shpilberg O, Drobyski WR, Porter DL, Giralt S, Champlin R, Goodman SA, Wolff SN, Hu W, Verfaillie C, List A, Dalton W, Ognoskie N,

- Chetrit A, Antin JH, Nemunaitis J. 1997. Donor leukocyte infusions in 140 patients with relapsed malignancy after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Oncol*, 15 (2):433-444.
- Copelan EA. 2006. Hematopoietic stem-cell transplantation. *N Engl J Med*, 354 (17):1813-1826.
- Cwynarski K, Roberts IA, Iacobelli S, van Biezen A, Brand R, Devergie A, Vossen JM, Aljurf M, Arcese W, Locatelli F, Dini G, Niethammer D, Niederwieser D, Apperley JF, Paediatric, Chronic Leukaemia Working Parties of the European Group for B, Marrow T. 2003. Stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia in children. *Blood*, 102 (4):1224-1231.
- Damm F, Heuser M, Morgan M, Yun H, Grosshennig A, Gohring G, Schlegelberger B, Dohner K, Ottmann O, Lubbert M, Heit W, Kanz L, Schlimok G, Raghavachar A, Fiedler W, Kirchner H, Dohner H, Heil G, Ganser A, Krauter J. 2010. Single nucleotide polymorphism in the mutational hotspot of WT1 predicts a favorable outcome in patients with cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*, 28 (4):578-585.
- Dvorak CC, Loh ML. 2014. Juvenile myelomonocytic leukemia: molecular pathogenesis informs current approaches to therapy and hematopoietic cell transplantation. *Front Pediatr*, 2:25.
- Elmaagacli AH, Beelen DW, Trenschele R, Schaefer UW. 2000. The detection of wt-1 transcripts is not associated with an increased leukemic relapse rate in patients with acute leukemia after allogeneic bone marrow or peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 25 (1):91-96.
- Flohr T, Schrauder A, Cazzaniga G, Panzer-Grumayer R, van der Velden V, Fischer S, Stanulla M, Basso G, Niggli FK, Schafer BW, Sutton R, Koehler R, Zimmermann M, Valsecchi MG, Gadner H, Masera G, Schrappe M, van Dongen JJ, Biondi A, Bartram CR, International BFMSG. 2008. Minimal residual disease-directed risk stratification using real-time quantitative PCR analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in the international multicenter trial AIEOP-BFM ALL 2000 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 22 (4):771-782.

- Gaiger A, Linnerth B, Mann G, Schmid D, Heinze G, Tisljar K, Haas OA, Gadner H, Lion T. 1999. Wilms' tumour gene (wt1) expression at diagnosis has no prognostic relevance in childhood acute lymphoblastic leukaemia treated by an intensive chemotherapy protocol. *Eur J Haematol*, 63 (2):86-93.
- Gamis AS. 2005. Acute myeloid leukemia and Down syndrome evolution of modern therapy--state of the art review. *Pediatr Blood Cancer*, 44 (1):13-20.
- Gluckman E. 2000. Current status of umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation. *Exp Hematol*, 28 (11):1197-1205.
- Greaves M. 2006. Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer*, 6 (3):193-203.
- Guillaumet-Adkins A, Richter J, Odero MD, Sandoval J, Agirre X, Catala A, Esteller M, Prosper F, Calasanz MJ, Buno I, Kwon M, Court F, Siebert R, Monk D. 2014. Hypermethylation of the alternative AWT1 promoter in hematological malignancies is a highly specific marker for acute myeloid leukemias despite high expression levels. *J Hematol Oncol*, 7 (1):4.
- Hashii Y, Sato E, Ohta H, Oka Y, Sugiyama H, Ozono K. 2010. WT1 peptide immunotherapy for cancer in children and young adults. *Pediatr Blood Cancer*, 55 (2):352-355.
- Hasle H, Niemeyer CM, Chessells JM, Baumann I, Bennett JM, Kerndrup G, Head DR. 2003. A pediatric approach to the WHO classification of myelodysplastic and myeloproliferative diseases. *Leukemia*, 17 (2):277-282.
- Ho PA, Alonzo TA, Gerbing RB, Kuhn J, Pollard JA, Hirsch B, Raimondi SC, Gamis AS, Meshinchi S. 2014. The prognostic effect of high diagnostic WT1 gene expression in pediatric AML depends on WT1 SNP rs16754 status: report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer*, 61 (1):81-88.
- Horowitz MM. 2012. Does matched unrelated donor transplantation have the same outcome as matched sibling transplantation in unselected patients? *Best Pract Res Clin Haematol*, 25 (4):483-486.
- Hunger SP, Lu X, Devidas M, Camitta BM, Gaynon PS, Winick NJ, Reaman GH,

- Carroll WL. 2012. Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: a report from the children's oncology group. *J Clin Oncol*, 30 (14):1663-1669.
- Imashuku S, Terui K, Matsuyama T, Asami K, Tsuchiya S, Ishii E, Kawa K, Kosaka Y, Eguchi H, Tsuchida M, Ikuta K, Kato S, Koizumi S, Okamura J, Morimoto A, Hibi S, Hamaoka K, multi-institutional collaborative study in J. 2003. Lack of clinical utility of minimal residual disease detection in allogeneic stem cell recipients with childhood acute lymphoblastic leukemia: multi-institutional collaborative study in Japan. *Bone Marrow Transplant*, 31 (12):1127-1135.
- Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. 2013. Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet*, 381 (9881):1943-1955.
- Inagaki J, Fukano R, Nishikawa T, Nakashima K, Sawa D, Ito N, Okamura J. 2013. Outcomes of immunological interventions for mixed chimerism following allogeneic stem cell transplantation in children with juvenile myelomonocytic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*, 60 (1):116-120.
- Jacobsohn DA, Tse WT, Chaleff S, Rademaker A, Duerst R, Olszewski M, Huang W, Chou PM, Kletzel M. 2009. High WT1 gene expression before haematopoietic stem cell transplant in children with acute myeloid leukaemia predicts poor event-free survival. *Br J Haematol*, 146 (6):669-674.
- Justyna Jólkowska KD, Malgorzata Dawidowska. 2007. Methods of minimal residual disease (MRD) detection in childhood haematological malignancies. *J Appl Genet* 48 (1):pp. 77–83.
- K Inoue HS, H Ogawa, M Nakagawa, T Yamagami, H Miwa, K Kita, A Hiraoka, T, Nasu MaK. 1994. WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of MRD in acute Leukemia. *Blood*, 84:3071-3079.
- Kaspers GJ, Creutzig U. 2005. Pediatric acute myeloid leukemia: international progress and future directions. *Leukemia*, 19 (12):2025-2029.
- Kern W, Schoch C, Haferlach T, Schnittger S. 2005. Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol*, 56 (2):283-309.

- Kinlen L. 1988. Evidence for an infective cause of childhood leukaemia: comparison of a Scottish new town with nuclear reprocessing sites in Britain. *Lancet*, 2 (8624):1323-1327.
- Kletzel M, Olzewski M, Huang W, Chou PM. 2002. Utility of WT1 as a reliable tool for the detection of minimal residual disease in children with leukemia. *Pediatr Dev Pathol*, 5 (3):269-275.
- Klingebiel T. 2003. Stammzellentransplantation bei Kindern. Forschung Frankfurt.
- Kristensen T, Moller MB, Friis L, Bergmann OJ, Preiss B. 2011. NPM1 mutation is a stable marker for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukaemia patients with increased sensitivity compared to WT1 expression. *Eur J Haematol*, 87 (5):400-408.
- Kwon M, Martinez-Laperche C, Infante M, Carretero F, Balsalobre P, Serrano D, Gayoso J, Perez-Corral A, Anguita J, Diez-Martin JL, Buno I. 2012. Evaluation of minimal residual disease by real-time quantitative PCR of Wilms' tumor 1 expression in patients with acute myelogenous leukemia after allogeneic stem cell transplantation: correlation with flow cytometry and chimerism. *Biol Blood Marrow Transplant*, 18 (8):1235-1242.
- Lampert F, Harbott J, Borkhardt A. 2013. Cytogenetic aspects of childhood leukemias. *Klin Padiatr*, 225 Suppl 1:S30-33.
- Lange T, Hubmann M, Burkhardt R, Franke GN, Cross M, Scholz M, Leiblein S, Al-Ali HK, Edelmann J, Thiery J, Niederwieser D. 2011. Monitoring of WT1 expression in PB and CD34(+) donor chimerism of BM predicts early relapse in AML and MDS patients after hematopoietic cell transplantation with reduced-intensity conditioning. *Leukemia*, 25 (3):498-505.
- Lee EJ, Pollak A, Leavitt RD, Testa JR, Schiffer CA. 1987. Minimally differentiated acute nonlymphocytic leukemia: a distinct entity. *Blood*, 70 (5):1400-1406.
- Leung W, Pui CH, Coustan-Smith E, Yang J, Pei D, Gan K, Srinivasan A, Hartford C, Triplett BM, Dallas M, Pillai A, Shook D, Rubnitz JE, Sandlund JT, Jeha S, Inaba H, Ribeiro RC, Handgretinger R, Laver JH, Campana D. 2012. Detectable minimal residual disease before hematopoietic cell transplantation is prognostic but does not preclude cure for children with

- very-high-risk leukemia. *Blood*, 120 (2):468-472.
- Liesveld JL, Rothberg PG. 2008. Mixed chimerism in SCT: conflict or peaceful coexistence? *Bone Marrow Transplant*, 42 (5):297-310.
- Little M, Wells C. 1997. A clinical overview of WT1 gene mutations. *Hum Mutat*, 9 (3):209-225.
- Malagola M, Skert C, Ruggeri G, Turra A, Ribolla R, Cancelli V, Cattina F, Alghisi E, Bernardi S, Perucca S, Di Palma A, Borlenghi E, Pagani C, Rossi G, Caimi L, Russo D. 2014. Peripheral Blood WT1 Expression Predicts Relapse in AML Patients Undergoing Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Biomed Res Int*, 2014:123079.
- Manola KN. 2009. Cytogenetics of pediatric acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol*, 83 (5):391-405.
- Millot F, Traore P, Guilhot J, Nelken B, Leblanc T, Leverger G, Plantaz D, Bertrand Y, Bordigoni P, Guilhot F. 2005. Clinical and biological features at diagnosis in 40 children with chronic myeloid leukemia. *Pediatrics*, 116 (1):140-143.
- Niegemann E, Wehner S, Kornhuber B, Schwabe D, Ebener U. 1999. wt1 gene expression in childhood leukemias. *Acta Haematol*, 102 (2):72-76.
- Niethammer D, Bader P, Handgretinger R, Klingebiel T. 2013. Stem cell transplantation. *Klin Padiatr*, 225 Suppl 1:S94-98.
- Ogawa H, Tamaki H, Ikegame K, Soma T, Kawakami M, Tsuboi A, Kim EH, Hosen N, Murakami M, Fujioka T, Masuda T, Taniguchi Y, Nishida S, Oji Y, Oka Y, Sugiyama H. 2003. The usefulness of monitoring WT1 gene transcripts for the prediction and management of relapse following allogeneic stem cell transplantation in acute type leukemia. *Blood*, 101 (5):1698-1704.
- Ostergaard M, Olesen LH, Hasle H, Kjeldsen E, Hokland P. 2004. WT1 gene expression: an excellent tool for monitoring minimal residual disease in 70% of acute myeloid leukaemia patients - results from a single-centre study. *Br J Haematol*, 125 (5):590-600.
- Petit T, Raynal B, Socie G, Landman-Parker J, Bourhis JH, Gluckman E, Pico J, Brison O. 1994. Highly sensitive polymerase chain reaction methods show the frequent survival of residual recipient multipotent progenitors after non-T-cell-depleted bone marrow transplantation. *Blood*, 84 (10):3575-3583.

- Pozzi S, Geroldi S, Tedone E, Luchetti S, Grasso R, Colombo N, Di Grazia C, Lamparelli T, Gualandi F, Ibatizi A, Bregante S, Van Lint MT, Raiola AM, Dominietto A, Varaldo R, Signori A, Bacigalupo A. 2013. Leukaemia relapse after allogeneic transplants for acute myeloid leukaemia: predictive role of WT1 expression. *Br J Haematol*, 160 (4):503-509.
- Preston DL, Kusumi S, Tomonaga M, Izumi S, Ron E, Kuramoto A, Kamada N, Dohy H, Matsuo T, Matsui T, et al. 1994. Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part III. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma, 1950-1987. *Radiat Res*, 137 (2 Suppl):S68-97.
- Pui CH, Evans WE. 2006. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*, 354 (2):166-178.
- Pulsipher MA, Bader P, Klingebiel T, Cooper LJ. 2009. Allogeneic transplantation for pediatric acute lymphoblastic leukemia: the emerging role of peritransplantation minimal residual disease/chimerism monitoring and novel chemotherapeutic, molecular, and immune approaches aimed at preventing relapse. *Biol Blood Marrow Transplant*, 15 (1 Suppl):62-71.
- Puumala SE, Ross JA, Aplenc R, Spector LG. 2013. Epidemiology of childhood acute myeloid leukemia. *Pediatr Blood Cancer*, 60 (5):728-733.
- Rein LA, Chao NJ. 2014. WT1 vaccination in acute myeloid leukemia: new methods of implementing adoptive immunotherapy. *Expert Opin Investig Drugs*, 23 (3):417-426.
- Rettinger E, Willasch AM, Kreyenberg H, Borkhardt A, Holter W, Kremens B, Strahm B, Woessmann W, Mauz-Koerholz C, Gruhn B, Burdach S, Albert MH, Schlegel PG, Klingebiel T, Bader P. 2011. Preemptive immunotherapy in childhood acute myeloid leukemia for patients showing evidence of mixed chimerism after allogeneic stem cell transplantation. *Blood*, 118 (20):5681-5688.
- Rezvani K. 2011. Posttransplantation vaccination: concepts today and on the horizon. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2011:299-304.
- Rezvani K, Yong AS, Savani BN, Mielke S, Keyvanfar K, Gostick E, Price DA, Douek DC, Barrett AJ. 2007. Graft-versus-leukemia effects associated with detectable Wilms tumor-1 specific T lymphocytes after allogeneic

- stem-cell transplantation for acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 110 (6):1924-1932.
- Roddie C, Peggs KS. 2011. Donor lymphocyte infusion following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Expert Opin Biol Ther*, 11 (4):473-487.
- Rodrigues PC, Oliveira SN, Viana MB, Matsuda EI, Nowill AE, Brandalise SR, Yunes JA. 2007. Prognostic significance of WT1 gene expression in pediatric acute myeloid leukemia. *Pediatr Blood Cancer*, 49 (2):133-138.
- Ross ME, Mahfouz R, Onciu M, Liu HC, Zhou X, Song G, Shurtleff SA, Pounds S, Cheng C, Ma J, Ribeiro RC, Rubnitz JE, Girtman K, Williams WK, Raimondi SC, Liang DC, Shih LY, Pui CH, Downing JR. 2004. Gene expression profiling of pediatric acute myelogenous leukemia. *Blood*, 104 (12):3679-3687.
- Roux E, Helg C, Chapuis B, Jeannet M, Roosnek E. 1994. Mixed chimerism after bone marrow transplantation and the risk of relapse. *Blood*, 84 (12):4385-4386.
- Roux E, Abdi K, Speiser D, Helg C, Chapuis B, Jeannet M, Roosnek E. 1993. Characterization of mixed chimerism in patients with chronic myeloid leukemia transplanted with T-cell-depleted bone marrow: involvement of different hematologic lineages before and after relapse. *Blood*, 81 (1):243-248.
- Sawada A, Sakata N, Kishimoto T, Higuchi B, Koyama M, Kondo O, Sato E, Okamura T, Yasui M, Inoue M, Yoshioka A, Kawa K. 2009. Significance of four MRD markers in MRD-based treatment strategy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*, 33 (12):1710-1713.
- Scharnhorst V, van der Eb AJ, Jochemsen AG. 2001. WT1 proteins: functions in growth and differentiation. *Gene*, 273 (2):141-161.
- Shi-Xia X, Hai-Qin X, Xian-Hua T, Bo F, Xiang-Feng T. 2011. Comparison of reduced intensity and myeloablative conditioning regimens for stem cell transplantation in patients with malignancies: a meta-analysis. *Clin Transplant*, 25 (2):E187-198.
- Steinbach D, Hermann J, Viehmann S, Zintl F, Gruhn B. 2002. Clinical

- implications of PRAME gene expression in childhood acute myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*, 133 (2):118-123.
- Stem Cell Trialists' Collaborative G. 2005. Allogeneic peripheral blood stem-cell compared with bone marrow transplantation in the management of hematologic malignancies: an individual patient data meta-analysis of nine randomized trials. *J Clin Oncol*, 23 (22):5074-5087.
- Sugiyama H. 2001. Wilms' tumor gene WT1: its oncogenic function and clinical application. *Int J Hematol*, 73 (2):177-187.
- Sugiyama H. 2010. WT1 (Wilms' tumor gene 1): biology and cancer immunotherapy. *Jpn J Clin Oncol*, 40 (5):377-387.
- Suttorp M, Yaniv I, Schultz KR. 2011. Controversies in the treatment of CML in children and adolescents: TKIs versus BMT? *Biol Blood Marrow Transplant*, 17 (1 Suppl):S115-122.
- Taly Glaubach M, *, Lisa J. Robinson M. 2014. Pediatric myelodysplastic syndrome: They do exist! *J Pediatr Hematol Oncol*, 36:1–7.
- Tamaki H, Ogawa H, Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Iwama H, Inoue K, Soma T, Oka Y, Tatekawa T, Oji Y, Tsuboi A, Kim EH, Kawakami M, Fuchigami K, Tomonaga M, Toyama K, Aozasa K, Kishimoto T, Sugiyama H. 1999. The Wilms' tumor gene WT1 is a good marker for diagnosis of disease progression of myelodysplastic syndromes. *Leukemia*, 13 (3):393-399.
- Tamaki H, Mishima M, Kawakami M, Tsuboi A, Kim EH, Hosen N, Ikegame K, Murakami M, Fujioka T, Masuda T, Taniguchi Y, Nishida S, Osumi K, Soma T, Oji Y, Oka Y, Kawase I, Sugiyama H, Ogawa H. 2003. Monitoring minimal residual disease in leukemia using real-time quantitative polymerase chain reaction for Wilms tumor gene (WT1). *Int J Hematol*, 78 (4):349-356.
- Thomas ED, Lochte HL, Jr., Cannon JH, Sahler OD, Ferrebee JW. 1959. Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. *J Clin Invest*, 38:1709-1716.
- Trka J, Kalinova M, Hrusak O, Zuna J, Krejci O, Madzo J, Sedlacek P, Vavra V, Michalova K, Jarosova M, Stary J, For Czech Paediatric Haematology Working G. 2002. Real-time quantitative PCR detection of WT1 gene

- expression in children with AML: prognostic significance, correlation with disease status and residual disease detection by flow cytometry. *Leukemia*, 16 (7):1381-1389.
- Ulmer A, Tabea Tauer J, Glauche I, Jung R, Suttorp M. 2013. TK inhibitor treatment disrupts growth hormone axis: clinical observations in children with CML and experimental data from a juvenile animal model. *Klin Padiatr*, 225 (3):120-126.
- Valkova V, Polak J, Markova M, Vitek A, Hajkova H, Salek C, Prochazka B, Cetkovsky P, Trneny M. 2013. Minimal residual disease detectable by quantitative assessment of WT1 gene before allogeneic stem cell transplantation in patients in first remission of acute myeloid leukemia has an impact on their future prognosis. *Clin Transplant*, 27 (1):E21-29.
- van den Brink MR, Porter DL, Giralt S, Lu SX, Jenq RR, Hanash A, Bishop MR. 2010. Relapse after allogeneic hematopoietic cell therapy. *Biol Blood Marrow Transplant*, 16 (1 Suppl):S138-145.
- van der Velden VH, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, van Dongen JJ. 2003. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia*, 17 (6):1013-1034.
- Weber G, Karbach J, Kuci S, Kreyenberg H, Willasch A, Koscielniak E, Tonn T, Klingebiel T, Wels WS, Jager E, Bader P. 2009. WT1 peptide-specific T cells generated from peripheral blood of healthy donors: possible implications for adoptive immunotherapy after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia*, 23 (9):1634-1642.
- Weisser M, Kern W, Rauhut S, Schoch C, Hiddemann W, Haferlach T, Schnittger S. 2005. Prognostic impact of RT-PCR-based quantification of WT1 gene expression during MRD monitoring of acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 19 (8):1416-1423.
- Wertheim GB, Bagg A. 2011. Minimal residual disease testing to predict relapse following transplant for AML and high-grade myelodysplastic syndromes. *Expert Rev Mol Diagn*, 11 (4):361-366.
- Willasch AM, Kreyenberg H, Shayegi N, Rettinger E, Meyer V, Zabel M, Lang P,

- Kremens B, Meisel R, Strahm B, Rossig C, Gruhn B, Klingebiel T, Niemeyer CM, Bader P. 2014. Monitoring of Hematopoietic Chimerism after Transplantation for Pediatric Myelodysplastic Syndrome: Real-Time or Conventional Short Tandem Repeat PCR in Peripheral Blood or Bone Marrow? *Biol Blood Marrow Transplant*.
- Willasch AM, Gruhn B, Coliva T, Kalinova M, Schneider G, Kreyenberg H, Steinbach D, Weber G, Hollink IH, Zwaan CM, Biondi A, van der Velden VH, Reinhardt D, Cazzaniga G, Bader P, Trka J, European Study Group on WTEiCAML. 2009. Standardization of WT1 mRNA quantitation for minimal residual disease monitoring in childhood AML and implications of WT1 gene mutations: a European multicenter study. *Leukemia*, 23 (8):1472-1479.
- Wiseman DH. 2011. Donor cell leukemia: a review. *Biol Blood Marrow Transplant*, 17 (6):771-789.
- Yang L, Han Y, Suarez Saiz F, Minden MD. 2007. A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story. *Leukemia*, 21 (5):868-876.
- Yoon JH, Kim HJ, Shin SH, Yahng SA, Lee SE, Cho BS, Eom KS, Kim YJ, Lee S, Min CK, Cho SG, Kim DW, Lee JW, Min WS, Park CW, Lim JH. 2013. BAALC and WT1 expressions from diagnosis to hematopoietic stem cell transplantation: consecutive monitoring in adult patients with core-binding-factor-positive AML. *Eur J Haematol*, 91 (2):112-121.
- Zhao XS, Jin S, Zhu HH, Xu LP, Liu DH, Chen H, Liu KY, Huang XJ. 2012. Wilms' tumor gene 1 expression: an independent acute leukemia prognostic indicator following allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant*, 47 (4):499-507.
- Zhao XS, Yan CH, Liu DH, Xu LP, Liu YR, Liu KY, Qin YZ, Wang Y, Huang XJ. 2013. Combined use of WT1 and flow cytometry monitoring can promote sensitivity of predicting relapse after allogeneic HSCT without affecting specificity. *Ann Hematol*, 92 (8):1111-1119.

8. Anhang

8.1. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,
ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

- Prof. Dr. B. Gruhn (Leiter Sektion Hämatologie, Onkologie und Stammzelltransplantation, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Jena)
- Susan Wittig (Hämatologisches Labor, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Jena)
- Frau I. Wolff (Medizinische Dokumentation, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Jena)
- Dr. Juliane Sanft (Institut für Rechtsmedizin, Jena)
- Dr. Thomas Lehmann (Institut für Medizinische Statistik, Informatik und Dokumentation, Jena)

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und
dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den

Caroline Woehlecke

8.2. Danksagung

Hiermit möchte ich all jenen danken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

An erster Stelle danke ich Prof. Dr. Bernd Gruhn für die Überlassung des Themas und seine sehr engagierte Betreuung. Seine Hilfe bei der Überarbeitung der eingereichten Manuskripte und dieser Arbeit haben einen entscheidenden Anteil an der Fertigstellung dieser Dissertation gehabt.

Ich danke Susan Wittig für die freundliche und kompetente Einarbeitung und Unterstützung bei der Arbeit im Labor.

Bei Herrn Dr. Thomas Lehmann vom Institut für Medizinische Statistik, Information und Dokumentation möchte ich mich für die geduldige und nette Beratung bei statistischen Fragen jeder Art bedanken.

Ich danke außerdem Dr. Juliane Sanft aus dem Institut für Rechtsmedizin für die Bereitstellung der Chimärismusbefunde.

Zuletzt möchte ich noch meinen Eltern für ihre mentale und finanzielle Unterstützung danken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.